

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : JP 2004-512497

(43) Date of Publication of application: 22.04.2004

---

(51)Int.Cl. G01N-033/50 ; C12Q-001/02 ; C12Q-001/28 ;  
C12Q-001/42 ; C12Q-001/68 ; G01N-027/327 ;  
G01N-027/48 ; G01N-033/15 ; G01N-033/53 ;  
G01N-033/566 ; G01N-037/00 ;

---

(21)Application number : 2002-506110 (71)Applicant : MINERVA BIOTECHNOLOGIES  
CORPORATION

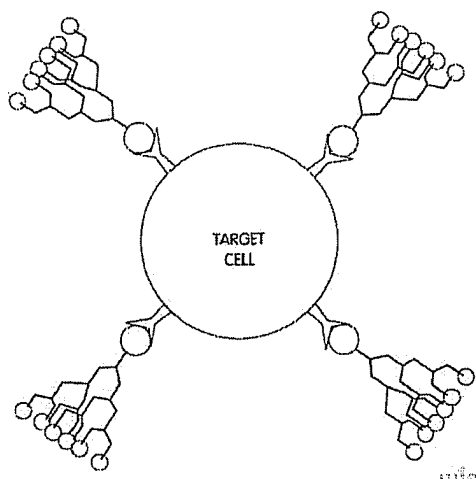
(22)Date of filing : 25.06.2001 (72)Inventor : BAMDAD, Cynthia, C.  
BAMDAD, R., Shoshana

---

## (54) INTERACTION OF COLLOID-IMMOBILIZED SPECIES WITH SPECIES ON NON-COLLOIDAL STRUCTURES

### (57)Abstract:

The invention provides novel techniques for derivatizing colloids with self-assembled monolayers. This provides the capability of a wide variety of assays including chemical or biochemical agent/agent interaction studies. Bio-derivatized colloids, with or without signaling entities, are used to probe interactions with species on non-colloidal structures. The invention provides techniques for immobilizing colloidal particles on a wide variety of non-colloidal structures. Included is the ability to decorate a variety of non-colloidal structures including beads, with colloids as a detectable assay. This allows, in many cases, assays detectable via the unaided human eye, as well as assays detectable via automated determination of a change of interaction of electromagnetic radiation with the colloids, e.g., absorption, light-scattering, and the like.



## 拒絶理由通知書

特許出願の番号	特願2006-535278
起案日	平成21年 4月22日
特許庁審査官	海野 佳子 3906 2J00
特許出願人代理人	鈴木 俊一郎 (外 3名) 様
適用条文	第29条第2項

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものです。これについて意見がありましたら、この通知書の発送の日から3か月以内に意見書を提出してください。

## 理 由

この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

## 記

## [引用例]

## 1. 特表2004-512497号公報

## 請求項1、2について／引用例1

引用例1 (【0080】、【0082】等を参照) には、インテグリン $\alpha V\beta 3$ と標識化ビトロネクチンを用いて、 $\alpha V\beta 3$ の作用を阻害する薬物をスクリーニングする方法が記載されており、リガンドであるビトロネクチンと共に薬物ライブラリーを添加すること、候補薬物がインテグリン $\alpha V\beta 3$ とビトロネクチンとの相互作用を妨害する場合には、シグナル損失が起きることも記載されている。

標識物質として蛍光物質を用いること、結合反応終了後に洗浄操作を行うことは、従来行われていることである。

よって、本願の請求項1、2に係る発明は、引用例1に記載された発明に基づいて、当業者が容易になし得たものである。

整理番号: 発送番号:273798 発送日:平成21年 4月28日 2/E

<拒絶の理由を発見しない請求項>

請求項3、4に係る発明については、現時点では、拒絶の理由を発見しない。  
拒絶の理由が新たに発見された場合には拒絶の理由が通知される。

この拒絶理由通知の内容に関するお問い合わせ、または面接のご希望がございましたら下記までご連絡下さい。

特許審査第一部 材料分析 海野佳子

TEL. 03 (3581) 1101 内線3252

-----  
先行技術文献調査結果の記録

・ 調査した分野 IPC G01N 33/48-98

G01N 37/00

G01N 33/53-577

G01N 33/543-556

DB名 JSTPlus (JDream2)

CAplus.(S.T.N)

・ 先行技術文献 Nathan J. P. Dubree et al., Selective a4b7 Integrin Antagonists and Their Potential as Antiinflammatory Agents, J. Med. Chem., 米国, 2002年 8月 1日, Vol.45, No.16, 3451-3457

特表2003-508352号公報

欧州特許出願公開第01308726号明細書

米国特許出願公開第2002/0102617号明細書

(注) 法律又は契約等の制限により、提示した非特許文献の一部又は全てが送付されない場合があります。

この先行技術文献調査結果の記録は拒絶理由を構成するものではありません。

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-512497

(P2004-512497A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 Z C C Z	2 GO 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 178 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2002-506110 (P2002-506110)  
 (86) (22) 出願日 平成13年6月25日 (2001.6.25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月24日 (2002.12.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/020168  
 (87) 国際公開番号 WO2002/001228  
 (87) 国際公開日 平成14年1月3日 (2002.1.3)  
 (31) 優先権主張番号 09/602, 778  
 (32) 優先日 平成12年6月23日 (2000.6.23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501291558  
 ミナーヴァ・バイオテクノロジーズ・コー  
 ポレーション  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州024  
 58, ニュートン, チャーチ・ストリート  
 142  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100076691  
 弁理士 増井 忠式  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100080137  
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】コロイドが固定された種と非コロイド構造上の種との相互作用

(57) 【要約】

要約書なし。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

非コロイド構造に関して固定化されるための能力をコロイド粒子に与えること；および非コロイド構造へのコロイド粒子の固定化を測定することを包含する方法。

## 【請求項 2】

コロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

補助的なシグナル伝達実体が、染料、色素、電気活性分子、化学ルミネッセンス部分、電気化学ルミネッセンス部分、蛍光部分、アップレギュレートしている蛍光体、またはホースラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを包含する酵素結合シグナル伝達部分を包含する請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

シグナル伝達実体がメタロセンを包含する、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

シグナル伝達実体がフェロセンまたはフェロセン誘導体を包含する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

複数のコロイド粒子が非コロイド構造に結合すること、および複数の粒子の非コロイド構造への結合を測定することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

複数のコロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

補助的なシグナル伝達実体が、染料、色素、電気活性分子、化学ルミネッセンス部分、電気化学ルミネッセンス部分、蛍光部分、アップレギュレートしている蛍光体、またはホースラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む酵素結合シグナル伝達部分を包含する請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

非コロイド構造に結合するか、または結合するように適合した生物学的または化学的作用物質、および粒子に結合するか、または結合するように適合した生物学的または化学的作用物質の結合パートナーを提供することをさらに含み、与える工程は作用物質および結合パートナーにより粒子が非コロイド構造に結合することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

非コロイド構造がビーズである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

ビーズがポリマー材料、アガロース、テンタゲル、および／または磁性材料を包含する、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

ビーズがポリスチレンビーズである、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

作用物質を非コロイド構造に結合させ、結合パートナーを粒子に結合させ、および作用物質と結合パートナーをお互いに結合させることを包含する、請求項 9 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

作用物質と結合パートナーがお互いに生物学的に結合させることを包含する、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

生物学的または化学的作用物質が薬物候補であり、そして結合パートナーが薬物候補の標的である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 16】

非コロイド構造がビーズである、請求項 15 に記載の方法。

50

## 【請求項 17】

非コロイド構造が本質的に平面の基質またはチップの表面である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 18】

生物学的または化学的作用物質が核酸配列である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 19】

生物学的または化学的作用物質がペプチドであり、そして結合パートナーがペプチドの結合パートナーである、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 20】

生物学的または化学的作用物質がタンパク質であり、そして結合パートナーがタンパク質の結合パートナーである、請求項 9 に記載の方法。

10

## 【請求項 21】

コロイド粒子が固定化リガンドを持ち、そして非コロイド構造がリガンドに対する結合パートナーを持つ、請求項 1 に記載の方法であって、標的へのリガンド結合の妨害のための候補薬物の存在下で、非コロイド構造に結合する能力をコロイド粒子に与えることを包含する前記方法。

## 【請求項 22】

非コロイド構造がビーズであり、複数のビーズ、ビーズへの結合に適合した複数の生物学的または化学的作用物質、複数の粒子、および粒子への結合に適合した生物学的または化学的作用物質の複数の結合パートナーを提供することをさらに包含し、ここで少なくともいくつかの作用物質および結合パートナーは互いに結合する能力を有することが推測される、請求項 1 に記載の方法であって、ここで少なくともビーズのいくつかを少なくとも粒子のいくつかに暴露すること、およびビーズへの粒子の固定化を測定することを包含する前記方法。

20

## 【請求項 23】

生物学的または化学的作用物質が薬物候補であり、そして結合パートナーが薬物候補の標的である、請求項 22 に記載の方法であって、それぞれが異なる固定化された薬物候補を持つ、2つの異なる位置に少なくとも第 1 および第 2 のビーズを提供すること、複数の粒子を少なくとも 2つのビーズに暴露すること、そして第 1 のビーズと第 2 のビーズへの粒子の結合を区別することを包含する前記方法。

30

## 【請求項 24】

少なくとも 2つのビーズがマルチウェルプレートの少なくとも 2つの異なるウェルに別々に位置する、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

生物学的または化学的作用物質が薬物候補であり、そして結合パートナーが薬物候補の標的である、請求項 22 に記載の方法であって、2つの異なる位置に薬物候補を持つ少なくとも 2つのビーズを用意すること、薬物候補の第 1 の標的を持つコロイド粒子の第 1 のセットに第 1 のビーズを暴露すること、および薬物候補の第 2 の標的を持つコロイド粒子の第 2 のセットに第 2 のビーズを暴露すること、ならびに第 1 のビーズへの第 1 のセットの粒子の結合に対して、第 2 のビーズへの第 2 のセットの粒子への結合を区別することを包含する前記方法。

40

## 【請求項 26】

粒子と相互作用して吸収されるか、または透過する電磁波放射のスペクトルの変化を測定することにより、非コロイド構造における粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 27】

目視検査により非コロイド構造における粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 28】

複数のビーズおよびビーズに結合した作用物質、複数の粒子および粒子に結合した結合パ

50

ートナーを用意すること、ならびにビーズに粒子を暴露すること、およびビーズにおける粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

作用物質または結合パートナーの少なくとも一つがそれぞれ、親和性タグ／結合パートナー結合により、非コロイド構造または粒子への結合に適合した、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 30】

作用物質または結合パートナーの少なくとも一つがそれぞれ、金属結合タグ／金属／キレート結合により非コロイド構造または粒子への結合に適合した、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 31】

作用物質または結合パートナーの少なくとも一つがそれに固定化された金属を配位結合させるキレートを持ち、そして作用物質または結合パートナーの少なくとも一つがポリアミノ酸タグにより誘導体化される、請求項 30 に記載の方法。

10

【請求項 32】

作用物質または結合パートナーの少なくとも一つが、自己組織化単分子層により、それぞれ非コロイド構造または粒子への結合に適合した、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 33】

作用物質または結合パートナーの少なくとも一つが、相補的核酸配列対により、それぞれビーズまたは粒子への結合に適合した、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 34】

結合パートナーがグルタチオン／グルタチオン-s トランスフェラーゼリガンド相互作用により、粒子への結合に適合した、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 35】

ポリマービーズを包含する少なくとも第 1 および第 2 の非コロイド構造ならびに、その第 1 および第 2 のビーズにそれぞれ結合した少なくとも第 1 および第 2 の作用物質を用意すること；

コロイド粒子に固定化された第 1 および／または第 2 の作用物質の推定結合パートナーをそれぞれが持つ複数のコロイド粒子を用意すること；

ビーズを粒子に暴露すること；そして

第 1 のビーズに対する第 2 のビーズへの粒子の結合を区別することを包含する、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 36】

第 1 および第 2 のポリマービーズに結合した第 1 および第 2 の作用物質が結合パートナーと生物学的または化学的相互作用をすると推測され、そして区別する工程が第 1 の作用物質と結合パートナーに対して第 2 の作用物質および結合パートナー間の生物学的相互作用を区別することを包含する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

以下のことを包含する請求項 9 に記載の方法：

それぞれが固定化された作用物質を持つ複数の、ビーズを包含する、非コロイド構造を用意すること；

コロイド粒子の第 1 のセットおよび第 2 のセットを用意することであって、第 1 のセットがそれに固定された作用物質の第 1 の推定結合パートナーをそれぞれ持ち、そして第 2 のセットがそれに固定された作用物質の第 2 の推定結合パートナーをそれぞれ持つこと；

40

少なくとも第 1 のビーズを粒子の第 1 のセットに、そして少なくとも第 2 のビーズを粒子の第 2 のセットに暴露すること；

第 1 のビーズへの第 1 の粒子のセットの結合に対して、ビーズへの第 2 の粒子のセットの結合を区別すること。

【請求項 38】

第 1 および第 2 の推定結合パートナーは作用物質と生物学的または化学的相互作用をすると推測され、そして区別する工程が作用物質と第 1 の推定結合パートナー間に対して、作用物質と第 2 の推定結合パートナー間の生物学的相互作用を識別することを包含する、請

50

求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

非コロイド構造が細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

粒子への結合に適合した、細胞表面の受容体またはタンパク質に対するリガンドを用意することをさらに含み、与える工程が受容体またはタンパク質と相互作用するリガンドにより粒子を細胞に結合させることを包含する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

リガンドが自己組織化単分子層を介して粒子に結合するように適合した、請求項 39 に記載の方法。

10

【請求項 42】

リガンドがペプチド、タンパク質、抗体、酵素、または小分子である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 43】

リガンドが親和性タグ／結合パートナー結合により、粒子に結合するように適合した、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 44】

リガンドが金属結合タグ／金属／キレート結合により、粒子に結合するように適合した、請求項 40 に記載の方法。

20

【請求項 45】

リガンドがポリアミノ酸タグを持ち、そして粒子が金属を配位結合させる固定化キレートを持つ、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

キレートがニトリロ三酢酸である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

粒子がニトリロ三酢酸を含む自己組織化単分子層を持つ、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

粒子が固定化キレートを含む自己組織化単分子層を持つ、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 49】

リガンドおよび粒子を細胞に暴露すること、リガンドを粒子に結合させること、および受容体またはタンパク質へのリガンドの結合を測定することを包含する、請求項 40 に記載の方法。

30

【請求項 50】

粒子と相互作用して吸収されるか、または透過する電磁波放射のスペクトルの変化を測定することにより、細胞上の粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 51】

電子工学的に細胞上の粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 52】

交流ボルタンメトリーにより、細胞上の粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 51 に記載の方法。

40

【請求項 53】

目視検査により、細胞上の粒子の固定化を測定することを包含する、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 54】

以下のことを包含する請求項 39 に記載の方法：  
その表面に受容体またはタンパク質を提示する細胞を用意すること；  
コロイド粒子を用意すること；および  
コロイド粒子を受容体またはタンパク質に結合させること。

50

## 【請求項 5 5】

コロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

非コロイド構造がその表面に受容体またはタンパク質を露出する細胞であり、粒子への結合に適合した受容体またはタンパク質に対するリガンドを用意すること、およびリガンドと受容体またはタンパク質間の相互作用を妨害するための候補薬物の存在下で細胞にリガンドおよび粒子を暴露すること；ならびに細胞への粒子の結合を測定することをさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

測定工程が、受容体またはタンパク質／標的タンパク質間の相互作用を妨害することにおける候補薬物の有効性を表す、細胞への粒子の結合の阻害を測定することを包含する、請求項 5 6 に記載の方法。

10

## 【請求項 5 8】

少なくとも第 1 および第 2 の細胞を異なる位置に提供すること；

第 1 の細胞を第 1 の細胞の細胞受容体またはタンパク質に対するリガンドおよびコロイド粒子、粒子への結合に適合したリガンド、ならびにリガンドと受容体またはタンパク質間の相互作用を妨害するための第 1 の候補薬物に暴露すること；および

第 2 の細胞にリガンドおよびコロイド、ならびにリガンドと受容体またはタンパク質間の相互作用を妨害するための第 2 の候補薬物を添加すること；ならびに

第 1 の細胞に対して第 2 の細胞への粒子の結合を区別すること；

20

を包含する、請求項 5 6 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

非コロイド構造がその表面に受容体またはタンパク質を露出する細胞である、請求項 1 に記載の方法であって、さらに：

少なくとも 2 つの細胞を異なる位置に提供すること；

細胞受容体またはタンパク質に対する異なる標的タンパク質およびそれぞれの標的タンパク質への結合に適合したコロイド粒子にそれぞれの細胞を暴露すること；および

細胞受容体またはタンパク質への異なる標的タンパク質の結合を表す、細胞への粒子の結合を測定すること、を包含する方法。

30

## 【請求項 6 0】

非コロイド構造が磁気ビーズであり、そしてコロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

シグナル伝達実体がメタロセンである、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

シグナル伝達実体がフェロセンまたはフェロセン誘導体である、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

作用物質および結合パートナーの存在下、さらに作用物質および結合パートナーを開裂する能力を有する酵素の存在下で粒子をビーズに暴露することを包含する、請求項 6 0 に記載の方法。

40

## 【請求項 6 4】

はじめに作用物質および結合パートナーを酵素に暴露し、その後粒子およびビーズを作用物質および結合パートナーに暴露することを包含する、請求項 6 3 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

作用物質、結合パートナー、および酵素の存在下、さらに酵素活性を調節するための候補薬物の存在下で粒子をビーズに暴露することを包含する、請求項 6 3 に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

結合パートナーが酵素による開裂が可能なタンパク質またはペプチドを包含する、請求項 6 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 6 7】

タンパク質がコロイド粒子への、およびビーズへの結合に適合した、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

タンパク質が金属結合タグおよびビオチンを含み、コロイドまたはビーズの一つが金属を配位結合するキレートを含み、および他のコロイドまたはビーズがストレプトアビジンを包含する、請求項 6 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 9】

タンパク質が金属結合タグおよびビオチンを含み、コロイドが金属を配位結合させるキレートを含み、そしてビーズがストレプトアビジンを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

10

## 【請求項 7 0】

シグナル伝達実体がメタロセンであり、結合パートナーが酵素による開裂が可能なタンパク質を含む請求項 6 0 に記載の方法であって、作用物質、結合パートナー、および酵素の存在下、さらに酵素活性の調節のための候補薬物の存在下で粒子をビーズに暴露すること、ビーズを電極の近くに磁氣的に引き寄せること、および電極を活性化することにより電極へのメタロセンの接近度を測定し、それによって酵素の開裂活性を阻害する薬物候補の有効性を測定することを包含する前記方法。

## 【請求項 7 1】

実体を開裂する能力を有する酵素、および酵素活性を調節するための候補薬物の両方の存在下で、コロイド粒子および非コロイド構造の両方への結合に適合した実体にコロイド粒子および非コロイド構造を暴露することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 7 2】

非コロイド構造が磁気ビーズであり、コロイド粒子が固定化された電気活性種を持つ、請求項 7 1 に記載の方法であって、ビーズを電極の近くに磁氣的に引き寄せること、および電極を活性化することにより電極への電気活性種の接近度を測定し、それによって酵素の開裂活性を阻害する薬物候補の有効性を測定することを包含する、前記方法。

## 【請求項 7 3】

非コロイド構造が電極の表面であり、コロイド粒子が固定化された電気活性種を持つ、請求項 7 1 に記載の方法であって、電極をコロイド粒子、コロイド粒子および電極の両方への結合に適合した実体、酵素、および候補薬物に暴露すること、および電極を活性化することにより電極への電気活性種の接近度を測定し、それによって酵素の開裂活性を阻害する薬物候補の有効性を測定することを包含する前記方法。

30

## 【請求項 7 4】

コロイド粒子および非コロイド構造を、非コロイド構造への結合に適合した酵素の基質、粒子への結合に適合した、酵素活性により基質に結合可能な分子種、および基質に対する酵素に暴露することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7 5】

酵素活性を調節するための候補薬物にコロイド粒子および非コロイド構造を暴露することをさらに包含する、請求項 7 4 に記載の方法。

## 【請求項 7 6】

非コロイド構造が磁気ビーズであり、コロイド粒子が固定化された電気活性実体を持つ、請求項 7 4 に記載の方法であって、ビーズを電極の近くに磁氣的に引き寄せること、および電極を活性化することにより電極への電気活性実体の接近度を測定し、それによって酵素の活性を調節する薬物候補の有効性を測定することを包含する前記方法。

40

## 【請求項 7 7】

非コロイド構造が電極の表面であり、コロイド粒子が固定化された電気活性実体を持つ、請求項 7 4 に記載の方法であって、電極表面をコロイド粒子、基質、酵素、および候補薬物に暴露すること、および電極を活性化することにより電極への電気活性実体の接近度を測定し、それによって酵素の活性を調節する薬物候補の有効性を測定することを包含する前記方法。

50

## 【請求項 7 8】

非コロイド構造が磁気ビーズである、請求項 7 4 に記載の方法。

## 【請求項 7 9】

コロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項 7 8 に記載の方法。

## 【請求項 8 0】

シグナル伝達実体がメタロセンである、請求項 7 8 に記載の方法。

## 【請求項 8 1】

シグナル伝達実体がフェロセンまたはフェロセン誘導体である、請求項 7 8 に記載の方法。

## 【請求項 8 2】

基質および結合パートナーの存在下、さらに酵素活性を調節するための候補薬物の存在下で粒子をビーズに暴露することを包含する、請求項 7 8 に記載の方法。

## 【請求項 8 3】

結合パートナーが金属結合タグ／金属／キレート結合により粒子に結合するように適合し、そして基質がビオチン／ストレプトアバジン結合によりビーズに結合するように適合した、請求項 8 2 に記載の方法。

## 【請求項 8 4】

シグナル伝達実体がメタロセンである請求項 8 2 に記載の方法であって、ビーズを電極の近くに磁氣的に引き寄せること、および電極を活性化することにより電極へのメタロセンの接近度を測定し、それによって酵素活性を調節する薬物候補の有効性を測定することを包含する前記方法。

## 【請求項 8 5】

複数のシグナル伝達実体により、第 1 の生物学的または化学的作用物質の単一の結合を第 2 の生物学的または化学的作用物質にシグナル伝達することを包含する方法。

## 【請求項 8 6】

単一の結合を複数のシグナル伝達実体により同時にシグナル伝達することを包含する、請求項 8 5 に記載の方法。

## 【請求項 8 7】

複数のシグナル伝達実体を持つ第 1 の作用物質を提供すること、第 1 の作用物質を第 2 の作用物質に結合させること、およびシグナル伝達実体により結合を測定することを包含する、請求項 8 5 に記載の方法。

## 【請求項 8 8】

シグナル伝達実体が固定化された粒子に第 1 の作用物質が結合する、請求項 8 7 に記載の方法。

## 【請求項 8 9】

ポリマーにより第 1 の作用物質がシグナル伝達実体に結合する、請求項 8 7 に記載の方法。

## 【請求項 9 0】

第 1 の作用物質がデンドリマーによりシグナル伝達実体に結合する、請求項 8 7 に記載の方法。

## 【請求項 9 1】

第 1 の作用物質が生物学的または化学的リガンドであり、そして第 2 の作用物質がその表面に受容体またはタンパク質を提示する細胞である、請求項 8 7 に記載の方法であって、リガンドが受容体またはタンパク質に結合させることを包含する前記方法。

## 【請求項 9 2】

複数のシグナル伝達実体が第 1 の作用物質に結合したポリマーに結合した複数のシグナル伝達実体を包含する、請求項 8 7 に記載の方法。

## 【請求項 9 3】

複数のシグナル伝達実体が第 1 の作用物質に結合したデンドリマーに結合した複数のシグナル伝達実体を包含する、請求項 8 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9 4】

複数の固定化されたシグナル伝達実体を含むコロイド粒子に第 1 の作用物質を固定した、請求項 8 7 に記載の方法。

## 【請求項 9 5】

複数のシグナル伝達実体が複数の電気活性分子を包含する、請求項 8 5 に記載の方法。

## 【請求項 9 6】

複数の電気活性分子が複数のメタロセンを包含する、請求項 9 5 に記載の方法。

## 【請求項 9 7】

複数の電気活性分子が複数のフェロセンまたはフェロセン誘導体を包含する、請求項 9 5 に記載の方法。

10

## 【請求項 9 8】

ポリマーが親和性タグ／結合パートナー結合により第 1 の作用物質に結合した、請求項 9 2 に記載の方法。

## 【請求項 9 9】

ポリマーが結合タグ／金属／キレート結合により第 1 の作用物質に結合する、請求項 9 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 0】

第 1 の作用物質がポリアミノ酸タグを有し、そしてポリマーが金属を配位結合させるキレートを持つ、請求項 9 9 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 0 1】

デンドリマーが結合タグ／金属／キレート結合により第 1 の作用物質に結合する、請求項 9 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 2】

第 1 の作用物質がポリアミノ酸タグを持ち、そしてデンドリマーが金属を配位結合させるキレートを持つ、請求項 1 0 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 3】

少なくとも補助的なシグナル伝達実体の一つが、染料、色素、電気活性分子、蛍光部分、アップレギュレートしている蛍光体、またはホスラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む酵素結合シグナル伝達部分を包含する請求項 8 5 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 0 4】

タンパク質またはリガンドのいずれも標識せずに S P R の非存在下でタンパク質／リガンド相互作用を測定することを包含する方法。

## 【請求項 1 0 5】

リガンドと相互作用すると推測されるタンパク質にリガンド、すなわちタンパク質への接近度に依存した電気活性シグナルを有する、電気活性実体と一定の近接関係にあるリガンド、を暴露することを包含する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 6】

電気活性実体が、電気活性実体とタンパク質間の接近度の変化に依存して変わることができる電気活性シグナルを有する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

40

## 【請求項 1 0 7】

リガンドと電気活性実体がともに固定化される表面にタンパク質を暴露することを包含する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 8】

表面が電極の表面である、請求項 1 0 7 に記載の方法。

## 【請求項 1 0 9】

リガンドおよび電気活性実体がそれぞれ表面の自己組織化単分子層の部分形成する、請求項 1 0 7 に記載の方法。

## 【請求項 1 1 0】

自己組織化単分子層が、電子に対する自己組織化単分子層の透過性を促進する種を含む、

50



請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

電子に対する透過性を促進する種が伝導性自己組織化単分子層形成種を包含する、請求項 1 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

電子に対する透過性を促進する種が自己組織化単分子層に欠陥部位を生じさせる種を包含する、請求項 1 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

電気活性実体がメタロセンを包含する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

電気活性実体がフェロセンまたはフェロセン誘導体を包含する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

電気活性実体がフェロセンジカルボン酸を包含する、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

リガンドが親和性タグ／結合パートナー結合により自己組織化単分子層形成種に結合する、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

リガンドが金属結合タグ／金属／キレート結合により自己組織化単分子層形成種に結合する、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

以下のことを包含する方法：

a) i) コロイド（前記コロイドは細胞表面分子と相互作用することができるリガンドを包含する）を包含する溶液、および ii) 成長細胞を包含する電極を包含する組成物（前記細胞は前記リガンドと相互作用することができる少なくとも 1 つの細胞表面分子を包含する）を提供すること、

b) 少なくとも前記コロイドの部分を前記組成物に添加すること。

【請求項 1 1 9】

さらに以下のことを包含する請求項 1 1 8 に記載の方法：

c) 前記リガンドと前記細胞表面分子の相互作用の尺度として前記コロイドの凝集を検出すること。

【請求項 1 2 0】

前記コロイドが金コロイドである、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

工程（a）の前に、前記金コロイドがチオール基を取り込むように処理される、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

工程（a）の前に、前記リガンドが結合パートナーを有する部分により誘導体化される、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

工程（a）の前に、前記リガンドが金属キレートに結合することができる部分により誘導体化される、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記部分がヒスチジンタグを包含する、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

以下のことを包含する方法：

a) i) コロイド（前記コロイドは細胞表面分子と相互作用することができるリガンドを含む）を包含する溶液、ii) 候補薬物、および iii) 成長細胞を包含する電極を包含する組成物（前記細胞は前記リガンドと相互作用することができる少なくとも 1 つの細胞表面分子を包含する）を提供すること、

10

20

30

40

50

b) 少なくとも前記コロイドの部分を前記薬物および前記組成物と混合すること。

【請求項 1 2 6】

磁気材料を使用して電子工学的シグナル伝達実体を電極に補充することを包含する方法。

【請求項 1 2 7】

シグナル伝達実体と磁気ビーズ間の固定化に關与するタンパク質／タンパク質結合により部分的に電極にシグナル伝達実体を補充することを包含する、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

タンパク質／タンパク質結合が抗体ではないタンパク質を伴う、請求項 1 2 7 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 9】

表面、および表面に關してそれぞれ固定化されたタンパク質および電気活性実体と相互作用すると推測されるリガンドを有するアーティクル。

【請求項 1 3 0】

表面に關して固定化された電子の表面の透過性を促進する種をさらに包含する、請求項 1 2 9 に記載のアーティクル。

【請求項 1 3 1】

第 2 の作用物質への生物学的または化学的結合が可能な、複数のシグナル伝達実体に關して固定化された第 1 の生物学的または化学的作用物質を包含するアーティクル。

【請求項 1 3 2】

シグナル伝達実体が固定化される粒子に第 1 の作用物質が結合する、請求項 1 3 1 に記載のアーティクル。

20

【請求項 1 3 3】

第 1 の作用物質がポリマーによりシグナル伝達実体に關して固定化される、請求項 1 3 1 に記載のアーティクル。

【請求項 1 3 4】

第 1 の作用物質がデンドリマーによりシグナル伝達実体に關して固定化される、請求項 1 3 1 に記載のアーティクル。

【請求項 1 3 5】

表面、およびアーティクルの表面に形成された自己組織化単分子層を有するアーティクルであって、単分子層は第 1 分子種（表面が暴露される流体と表面との電氣的連絡を妨げるように、堅く詰まった様式で他の第 1 分子種とともに表面での自己組織化を促進する分子構造を有する）と第 2 分子種（第 1 の種と異なる分子構造を有し、堅く詰まった自己組織化構造の破壊を引き起こして、堅く詰まった構造中に欠陥を生じ、表面が曝露される流体と表面の電氣的連絡を可能にする）の混合物を包含する、上記アーティクル。

30

【請求項 1 3 6】

第 1 の種が本質的に直線状であり、第 2 の種が少なくとも 1 つの非直線部分を包含する、請求項 3 5 に記載のアーティクル。

【請求項 1 3 7】

第 1 分子が細胞表面受容体またはタンパク質と相互作用することができるリガンドである、前記第 1 分子および固体支持体に結合した 1 つまたはそれより多くのシグナル伝達実体を包含する組成物。

40

【請求項 1 3 8】

前記固体支持体がコロイドである、請求項 1 3 7 に記載の組成物。

【請求項 1 3 9】

前記コロイドが金コロイドである、請求項 1 3 8 に記載の組成物。

【請求項 1 4 0】

前記リガンドが直接前記コロイドに共有結合する、請求項 1 3 8 に記載の組成物。

【請求項 1 4 1】

前記シグナル伝達実体が電気活性分子である、請求項 1 3 8 に記載の組成物。

50

## 【請求項 1 4 2】

前記電気活性分子がフェロセンまたはフェロセン誘導体を包含する、請求項 1 4 1 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 3】

前記リガンドがペプチドである、請求項 1 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 4】

前記ペプチドが金属キレートに結合することができる部分とともに誘導体化される、請求項 1 4 3 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 5】

前記部分がヒスチジンタグを包含する、請求項 1 4 4 に記載の組成物。

10

## 【請求項 1 4 6】

前記固体支持体が金属キレートを含み、そして前記ペプチドが前記金属キレートへの前記部分の結合により前記固体支持体に結合する、請求項 1 4 4 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 7】

固体支持体が第 2 分子の単分子層を包含する、請求項 1 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 8】

前記単分子層が自己組織化単分子層である、請求項 1 4 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4 9】

前記第 2 分子がチオールである、請求項 1 4 7 に記載の組成物。

20

## 【請求項 1 5 0】

固体支持体に結合した第 1 分子、第 2 分子および第 3 分子を包含する組成物：ここで前記第 1 分子は細胞表面受容体またはタンパク質と相互作用可能なりガンドを含み、ここで第 2 分子は前記固体支持体上で単分子層を形成し、そしてここで前記第 3 分子は電気活性である。

## 【請求項 1 5 1】

前記固体支持体がコロイドである、請求項 1 5 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 2】

前記コロイドが金コロイドである、請求項 1 5 1 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 3】

前記リガンドが前記コロイドに直接共有結合する、請求項 1 5 1 に記載の組成物。

30

## 【請求項 1 5 4】

前記電気活性分子がフェロセンまたはフェロセン誘導体を包含する、請求項 1 5 3 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 5】

前記リガンドがペプチドである、請求項 1 5 3 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 6】

前記ペプチドが金属キレートに結合可能な部分とともに誘導体化される、請求項 1 5 5 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 7】

前記部分がヒスチジンタグを包含する、請求項 1 5 6 に記載の組成物。

40

## 【請求項 1 5 8】

前記固体支持体が金属キレートを含み、そして前記ペプチドが前記金属キレートへの前記部分の結合により前記固体支持体に結合する、請求項 1 5 6 に記載の組成物。

## 【請求項 1 5 9】

前記固体支持体がリポソームである、請求項 1 3 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 6 0】

前記リポソームが反応基を含有する少なくとも 1 つの脂質を包含する、請求項 1 4 7 に記載の組成物。

## 【請求項 1 6 1】

表面上で細胞の成長を支持するように構築され、配列された金属支持体を包含するアーテ

50

ィクル：前記金属支持体は少なくとも1つのタイプの分子の単分子層を含み、前記単分子層は金属支持体を電極として使用できるように設計される。

【請求項162】

金属支持体上で増殖する細胞をさらに包含する、請求項161に記載のアーティクル。

【請求項163】

以下のものを包含する組成物：

コロイド粒子

コロイド粒子に関して固定化されたシグナル伝達実体；および

コロイド粒子に関して固定化されたタンパク質。

【請求項164】

以下のものを包含する組成物：

生物学的または化学的作用物質に結合するように適合した複数のシグナル伝達実体を持つポリマーまたはデンドリマー。

【請求項165】

ポリマーまたはデンドリマーが金属結合タグ／金属／キレート結合により化学的または生物学的的作用物質に結合するように適合した、請求項164に記載の種。

【請求項166】

ポリマーまたはデンドリマーが金属を配位結合させることができるキレートを持つ、請求項164に記載の種。

【請求項167】

ポリマーまたはデンドリマーが複数の電気活性種を持つ、請求項164に記載の種。

【請求項168】

ポリマーまたはデンドリマーが複数のメタロセンを持つ、請求項164に記載の種。

【請求項169】

ポリマーまたはデンドリマーが複数のフェロセンまたはフェロセン誘導体を持つ、請求項164に記載の種。

【請求項170】

グルタチオン誘導体に関して固定化されたコロイド粒子および少なくとも1つのシグナル伝達実体を包含するアーティクル。

【請求項171】

グルタチオン誘導体を包含する自己組織化単分子層を表面上に持つコロイド粒子を包含するアーティクル。

【請求項172】

非コロイド構造が生物学的試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項173】

生物学的試料がヒトまたは動物から採取される、請求項172に記載の方法。

【請求項174】

生物学的試料が細胞または組織切片を包含する、請求項173に記載の方法。

【請求項175】

少なくとも第1および第2生物学的試料を用意すること；  
試料により提示される結合パートナーに結合する能力が推測されるまたはそれを有する固定化された種を持つコロイド粒子に、第1および第2試料を暴露すること、  
を包含する請求項172に記載の方法。

【請求項176】

第1および第2生物学的試料が感染または疾病の異なる状態の試料である、請求項175に記載の方法。

【請求項177】

異なる試料に対する結合と第1試料へのコロイド粒子の結合の違いを測定することを包含する、請求項175に記載の方法。

【請求項178】

10

20

30

40

50

違いが結合レベルの違いを包含する、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 179】

違いがコロイド固定化パターンの違いである、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 180】

試料のいずれかまたは両方へのコロイド粒子の固定化を測定することをさらに包含する請求項 175 に記載の方法。

【請求項 181】

試料により発現された、結合パートナーの発現レベルおよび／またはパターンにより測定できる疾患状態の修飾のための候補薬物で生物学的試料またはその供与源が前処理されている、請求項 175 に記載の方法。

10

【請求項 182】

非コロイド構造が表面を有するアーティクル、およびアーティクルの表面で形成される自己組織化単分子層を包含し、単分子層は第 1 分子種（表面が暴露されている流体と表面との電氣的連絡を妨げ、堅く詰まった様式で他の第 1 分子種とともに表面での自己組織化を促進する、分子構造を有する）と第 2 分子種（分子ワイヤを包含する）の混合物を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 183】

非コロイド構造が固体支持体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 184】

表面が電極の表面である、請求項 183 に記載の方法。

20

【請求項 185】

コロイド粒子の表面での自己組織化単分子層の部分をそれぞれ形成するリガンドおよび電気活性実体をさらに包含する、請求項 183 に記載の方法。

【請求項 186】

自己組織化単分子層が電子の自己組織化単分子層の透過性を促進する種を含む、請求項 185 に記載の方法。

【請求項 187】

電子の透過性を促進する種が伝導性自己組織化単分子層形成種を包含する、請求項 186 に記載の方法。

【請求項 188】

電子の透過性を促進する種が自己組織化単分子層中に欠陥部位を生じる種を包含する、請求項 186 に記載の方法。

30

【請求項 189】

電気活性実体がフェロセンジカルボン酸を包含する、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 190】

金属結合タグ／金属／キレート結合により、リガンドが自己組織化単分子層形成種に結合する、請求項 185 に記載の方法。

【請求項 191】

固体支持体を実質的に平面の基質を包含する、請求項 183 に記載の方法。

【請求項 192】

アーティクルの表面が自己組織化単分子層を持つ、請求項 183 に記載の方法。

40

【請求項 193】

自己組織化単分子層が伝導性自己組織化単分子層である、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 194】

自己組織化単分子層が親和性タグの結合パートナーを包含する、請求項 192 に記載の方法。

【請求項 195】

結合パートナーが金属を配位結合させることができるキレートである、請求項 194 に記載の方法。

【請求項 196】

50

親和性タグの結合パートナーがグルタチオンまたはビオチンを包含する、請求項194に記載の方法。

【請求項197】

EDC/NHSカップリング化学により自己組織化単分子層に固定される化学的または生物学的作用物質をさらに包含する、請求項193に記載の方法。

【請求項198】

自己組織化単分子層に固定され、そして自己組織化単分子層を横切って任意に分配される複数の化学的または生物学的結合パートナーを包含する、請求項193に記載の方法。

【請求項199】

自己組織化単分子層が、それに固定された唯一の化学的または生物学的結合パートナーをそれぞれさらに包含する隔離された領域を含む、請求項193に記載の方法。 10

【請求項200】

コロイド構造が結合パートナーであるか、または、アーティクルの表面に固定される化学的または生物学的作用物質の結合パートナーであると推測される、それに固定された化学的または生物学的作用物質を含む、請求項182に記載の方法。

【請求項201】

コロイド粒子が補助的なシグナル伝達実体を包含する、請求項200に記載の方法。

【請求項202】

コロイド粒子の表面に自己組織化単分子層をさらに包含する、請求項200に記載の方法 20

【請求項203】

補助的なシグナル伝達実体が電気活性シグナル伝達実体である、請求項201に記載の方法。

【請求項204】

補助的なシグナル伝達実体が可視シグナル伝達実体である、請求項201に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は一般に化学的および生化学的検出方法、そしてより具体的にはコロイドが電極、ビーズ、または細胞のような非コロイド構造に結合する技術、および複合シグナルが単一結合事象を表す技術に関する。薬物スクリーニングを含む技術が本発明により容易になる 30

【0002】

発明の背景

薬物の発見は、生理的条件下で標的受容体またはタンパク質と相互作用する多数の候補化合物をスクリーニングすることにより促進される。細胞表面受容体またはタンパク質がとりわけ重要である。腫瘍形成を促進する生体分子相互作用の多くは細胞内および細胞間シグナル伝達を共に媒介する細胞表面タンパク質に関連する。“腫瘍マーカー”は、新生物形成状態への形質転換の結果として排他的に発現されるか、または過剰発現される細胞表面上の分子である。これらのマーカーのいくつかは腫瘍の組織に侵入する能力に関連し、転移により特徴付けられる侵略的な成長過程を示す（これらの腫瘍は一般に患者にとって不良予後に繋がる）。たとえば、細胞表面受容体 $\alpha V \beta 3$ と細胞接着分子ビトロネクチン間の相互作用は血管新生に関連付けられている。J. Varner et al., “Integrins and cancer,” Curr Opin Cell Biol. 8:724 (1996); B. Vailhe et al., “In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to a  $\alpha V \beta 3$  integrin localization”, In Vitro Cell Dev Biol Anim., 33:763 (1997); M. Horton, “The  $\alpha V \beta 3$  integrin ‘vitronectin 40 50

receptor', " Int J Biochem Cell Biol, 29: 721 (1997) を参照されたい。実際、メラノーマ細胞上のこの受容体の増大した濃度は不良予後と関連付けられている。腫瘍形成および／または血管新生を促進する細胞表面受容体の別の例としては、MUC-1 抗原がある；この抗原は乳房、前立腺、肺および卵巣癌で過剰発現される。

#### 【0003】

腫瘍形成に関連する細胞表面受容体に結合し、阻害する薬物の探索は技術的に挑戦され続けてきた、なぜなら、無傷細胞で利用できるアッセイがほとんどないからである。リガンドと生きている無傷細胞の表面の標的受容体間の相互作用を検出する能力が、これらの相互作用を阻害する候補化合物のスクリーニングを可能にするであろう。細胞表面受容体の作用を阻害する薬物の化合物ライブラリーのスクリーニングは、薬物スクリーニング工程の間中、受容体が天然の配座および多量体化状態にあることに非常に依存する。現在の技術では、細胞表面受容体とそれらの天然のリガンドの相互作用を検出することは難しいか、または不可能である。

10

#### 【0004】

現在の技術は細胞上のリガンド相互作用をアッセイするそれらの能力が制限される。蛍光励起性セルソーティング (FACS) は、細胞表面受容体の検出を可能にする少数の技術の中の一つである。細胞表面受容体を阻害する薬物をスクリーニングするためにこの技術を使用することにおける一つの障害は：1) 技術が順次的で多数の薬物スクリーニングを促進するために容易に多重化することができないこと；および2) 技術が受容体に結合する抗体の検出だけに適しており；抗原抗体反応は一般に薬物が阻害できない、高親和性相互作用であるということである。現在の技術では、細胞表面受容体とそれらの天然のリガンドを検出することは難しいか、または不可能である。細胞表面受容体の作用を阻害する薬物の化合物ライブラリーのスクリーニングは、薬物スクリーニング工程の間中、受容体が天然の配座および多量体化状態にあることに非常に依存する。

20

#### 【0005】

細胞表面受容体について調べるために使用することのできる別の技術には、ELISA アッセイがある。この技術では、細胞を96ウェルプラスチックプレートに接着する。コグネイト抗体を関心のある細胞表面受容体に結合させ、非結合抗体は洗い流す。受容体のアベイラビリティはコグネイト抗体の存在を検出することにより推定される。結合抗体の存在は、コグネイト抗体の種に対して活性な、検出可能なレベルに結合した第2抗体を導入することにより検出される。細胞表面タンパク質のアベイラビリティの評価、またはそれらを阻害する薬物のスクリーニングのためのこの技術の有効性を限定するいくつかの固有の問題がある：1) 抗体のプラスチックへの非特異的吸着の結果生じる偽陽性により技術が妨害される；2) リガンド-受容体相互作用が多くの洗浄工程によりしばしば阻害される；そして最も重要なことには、3) このアッセイには天然のリガンドよりむしろ抗体を使用しなければならない；これらは典型的には高親和性相互作用をするため、受容体に結合する薬物が容易に阻害することができない；さらに天然のリガンドと異なり、抗体は受容体の正常な機能を阻害しない部位で標的受容体に結合するかもしれない。

30

#### 【0006】

必要なものは、化学的または生物学的種間の結合事象をモニターまたは制御するためのアプローチであって、そのアプローチは広範囲の特異的相互作用における万能性を増し、感受性を高めることができる。たとえば、細胞受容体とそれらのリガンドの特異的相互作用 ( $\alpha V \beta 3$  受容体の相互作用を含むが、それらに限定されない) を阻害する薬物のスクリーニングのためのアプローチは好都合であろう。後者の例において、アッセイは順応性を持つべきであり、その結果広範囲の腫瘍型、そしてとりわけ浸潤性腫瘍に対するスクリーニングが可能になる。重要なことは、スクリーニング法により多数の候補薬物の迅速なスクリーニングができることである。

40

#### 【0007】

発明の概要

50

本発明は、薬物スクリーニングに有用な技術を含む、各種新規方法、組成物、および種、ならびに化学的または生物学的種間の相互作用をモニター（検出）するためのアーティクルを提供する。本発明の主な側面としては以下のことが挙げられる。シグナル伝達相互作用のためのタンパク質チップおよび粒子を含む、プロテオミックス研究のための手段、および2粒子系のような多粒子系。多粒子系において、1粒子は補充可能な粒子であってもよく、他の粒子は補充可能な粒子によって提示される作用物質の結合パートナーを有していてもよく、そしてシグナル伝達実体であるか、または補助的なシグナル伝達実体を有していてもよい。他の主な部分としては、細胞研究、とりわけリガンドと細胞表面タンパク質および受容体間の相互作用を含む技術が挙げられる。これらの相互作用に影響を与えることができる薬物に関する発見および治療法も、血管新生に関連する薬物療法を特に強調して記載される。具体的に述べると、血管新生を阻害するか、または促進することができる細胞受容体／リガンド相互作用が記載される。他の部分としては、診断のために溶液中または無傷細胞の表面上のいずれかでタンパク質を検出することが挙げられる。

10

**【0008】**

一側面において、本発明は非コロイド構造に固定される能力をコロイド粒子に与える方法を提供し、そしてコロイド粒子が非コロイド構造に固定されているか否かを測定する。この側面はコロイド粒子または、好ましくは各種構造を有する多くのコロイド粒子を含む広範囲の相互作用を扱う。磁気ビーズのようなビーズを含む非コロイド構造は、ビーズに関して固定化された種とコロイド粒子に関して固定化された種との相互作用を測定する補助物としてコロイド粒子と相互作用することができる。コロイド粒子はビーズを“修飾”し、それらを特有の種／種相互作用の目安として肉眼的に同定できるようにすることができる。あるいは、磁気ビーズは表面にコロイド粒子を補充するために使用してもよく、そこでは粒子の同定を電子的もしくは電気化学的、または他の手段などにより行うことができる。電極のような非コロイド構造は、コロイド粒子またはコロイド粒子上に固定された種と共に作動し、具体的なアッセイ結果を示すことができる。細胞のような非コロイド構造は、コロイド構造と相互作用してコロイド粒子が持つ種への細胞の結合を示すことができる。コロイド粒子および非コロイド構造を含むこれらおよび他の技術の利点は、以下の説明からさらにいっそう明らかになるであろう。

20

**【0009】**

別の側面において、本発明は金属結合タグ／金属キレート結合により、ビーズ、コロイド粒子などのようなアーティクルに化学的または生物学的作用物質を結合させるための技術を提供する。このようにして化学的または生物学的種に結合したアーティクルは本発明に包含される。

30

**【0010】**

本発明の別の側面としては以下のことを伴うリガンド／タンパク質相互作用の検出のための技術が挙げられ、それらは電気活性実体との一定の近接関係にあるリガンドを提供すること、および電気活性実体により与えられた電気活性シグナルをモニターすることにより、リガンドとタンパク質との相互作用を測定することであり、そこではシグナルは電気活性実体のタンパク質への接近度に依存する。この技術は、第1の表面に固定化される第1のタンパク質を有し、および、第2の表面に同様に固定化される電気活性実体とともに、粒子であってもよい第2の表面に固定化される当該タンパク質と相互作用すると推定されるリガンドを有する、本発明のアーティクルによって促進されてもよい。本発明のこの側面は、タンパク質またはリガンドのどちらも標識せずに、表面プラズモン共鳴の非存在下でタンパク質／リガンド相互作用を測定する方法である本発明のある別の特色を容易にする。

40

**【0011】**

本発明は、第1の生物学的または化学的作用物質の単一の結合を、多数のシグナル伝達実体を持つ第2の生物学的または化学的作用物質に、シグナル伝達する方法を含む技術および成分も提供する。本発明により提供されるアーティクルはこの技術を容易にし、そしてそれは複数のシグナル伝達実体に結合した第2の作用物質に生物学的または化学的に結合

50



することができる、第1の生物学的または化学的作用物質を有する。複数のシグナル伝達実体は、複数のシグナル伝達実体を持つポリマーまたはデンドリマーとして作用物質に結合してもよく、そして作用物質への結合に適合する。また、技術はコロイド粒子に、たとえば複数のシグナル伝達実体もまた固定化されるコロイド粒子の表面に、作用物質を固定化することにより促進されてもよい。好ましい態様において、3以上のシグナル伝達実体が同時に単一の化学的または生物学的結合事象をシグナル伝達する。より好ましくは、少なくとも10、さらに好ましくは少なくとも50、そしてさらに好ましくは少なくとも1000または10,000シグナル伝達実体が本発明のこの側面に従って同時に単一の化学的または生物学的結合事象をシグナル伝達する。

#### 【0012】

本発明の別の側面は、シグナル伝達実体およびその上に固定化されたタンパク質を共に有するコロイド粒子により説明される。この成分の使用のための技術も本発明に包含される。

#### 【0013】

本発明は表面で自己組織化単分子層を横切る電子透過性を制御する技術も提供する。かかる技術において、自己組織化単分子層は表面上で形成され、そして少なくとも第1分子種と第2分子種の混合物により説明される。第1分子種は、表面が暴露されている流体と表面との電気的連絡を妨げる、堅く詰まった様式で表面での自己組織化を促進する構造を有する。すなわち、第1の種は、第1の種のみから形成されるSAM（自己組織化単分子層）については、流体に対して表面を密封する比較的堅く詰まった自己組織化単分子層（SAM）を形成する。本発明のこの側面に従ったSAMは第1の種、および、異なる分子構造を有し、ここでその分子構造は堅く詰まった自己組織化構造の破壊を生じる、第2の種から形成され、それによって表面が暴露されている流体が表面と電子的に連絡できるような堅く詰まった構造中の欠陥が明らかになる。このような状況において、流体は、トンネル効果などにより電気的連絡ができる表面に接触するか、または表面に十分に接近することにより、表面と電気的に連絡する。以下の説明から理解されるように、本発明のこの側面は本発明の他の技術と組み合わせると非常に有用になる。

#### 【0014】

先に述べたように、本発明の一態様は薬物スクリーニングのための一連の成分および技術を提供することである。方法は以下のことを提供する：1）普遍的なシグナル伝達要素への天然のリガンドの結合のためのモジュール系；2）それぞれのリガンドに多数のシグナル伝達要素が結合することによる増大した検出感度；3）より簡単な形式（洗浄工程、酵素的開裂および毒性基質の必要性がない）；4）好都合な電子的出力；および5）多重化の能力。

#### 【0015】

アッセイの一態様において、本発明は伝導性の固体支持体上に生きた、無傷の成長細胞、または細胞由来分子を固定化することを企図する。表面分子（たとえば、受容体）および細胞内シグナル伝達タンパク質を共に有する、そのような細胞または細胞由来分子は事実上表面または粒子様であってもよい固体支持体に結合する。これらの細胞または細胞由来分子に対するリガンド（または“結合パートナー”）は、既知および未知の両方のリガンドならびに推定薬物候補（他の固体支持体に結合していないか、または表面または粒子様構造に結合する）を含んでいてもよいもので、それらは2つの結合パートナー間の結合が生じ、検出されてもよいような様式で、他の細胞由来分子と相互作用する。結合パートナーまたはその結合支持体の一つは、検出装置により認識、定量が可能な作用物質により付加的に誘導体化されてもよい。次に、この（相互作用を介した）複合体は、結合していない結合パートナーと区別できる、結合した複合体の特性を使用した検出装置に運ばれる。

#### 【0016】

一態様において、金属支持体の伝導性を維持するように処理（たとえば、細胞増殖と共存できる分子で被覆される）されている金属支持体（たとえば、金）上で細胞の増殖が行われる。一態様において、分子の均質な伝導層は金属表面に付着させ、そこでは分子の絶縁

10

20

30

40

50

種（たとえば、飽和アルキルチオラート）で均一に被覆された金属より速い速度で電子を伝導させる。別の態様において、先に記載のように表面に暴露された流体が電氣的に連絡できる第1および第2の種の混合物を含む異質な分子の層である。別の態様において、異質な伝導性分子層は金属表面に付着させる；異質な層は、伝導性または高伝導性分子（または芝生の“欠陥”）により中断される、低または非-伝導性の種（たとえば、一つのような種または多数のそのような種）の芝生と見ることができる。

#### 【0017】

異質な伝導性層、または欠陥が流体／表面の電氣的連絡を促進させるような、異質な層の好ましい態様において、2つのタイプの分子を金属表面に付着させる：1）芝生を形成するために使用されるアルキルチオールスパーサー分子（非特異的吸着を阻害するためにエチレングリコール単位またはメチル基で停止する）および2）伝導性種または欠陥形成種。伝導性種は以下に記載の実験により容易に同定できる。一態様において、伝導性種は少なくとも1つの環状構造を含む（たとえば、ベンゼン環、ピリミジン環など）。別の態様において、伝導性種は環状構造を全く含まないが、 $-O-$ 、 $-OH-$ 、 $-NH_2-$ および $SH$ から選択される基を含む。

#### 【0018】

均質な伝導層の一態様において、1つのタイプの分子のみ、すなわち伝導性種だけを金属表面に付着させる。多数の伝導性種を使用する他の態様も企図される。欠陥形成分子の別の説明および、この手順の他の側面は以下に記載される。

#### 【0019】

先に述べたように、本発明は方法および組成物を共に企図する。一態様において、本発明は固体支持体に接着した第1分子および1以上のシグナル伝達要素（すなわち、分子または分子のクラスターであって、それらは光透過の変化、溶液の色の变化、電荷の変化などによる検出を含むがそれらに限定されないどのような手段によっても検出することができるシグナルを提供する）を含む組成物を企図し、ここで先の第1分子はリガンドであり、そしてタンパク質または細胞表面受容体と相互作用することができる。別の態様において、本発明は固体支持体に付けられた第1分子、第2分子および第3分子を含む組成物を企図し、ここで先の第1分子はタンパク質または細胞表面受容体と相互作用することができるリガンドを包含し、ここで先の第2分子は先の固体支持体上の単分子層を形成し、そしてここで先の第3分子は電気活性である。

#### 【0020】

本発明は固体支持体の性質により限定されることを意図しない。一態様において、固体支持体はコロイド（たとえば、金コロイド）である。固体支持体へのリガンドの結合の性質により限定されることも意図しない。一態様において、先のリガンドは固体支持体に（直接または別のリガンドを介して、もしくは結合部分により）共有結合的に連結される。別の態様において、リガンドは非共有結合的に、または静電性もしくはイオン性相互作用により連結する。

#### 【0021】

本発明は、蛍光分子、および呈色基質に作用することができる酵素を含むがそれらに限定されない、各種シグナル伝達要素を企図する。好ましい態様において、本発明は電気活性分子、すなわち適切で慣用の電氣的配置の作用電極の近傍で、電子的にまたは電気化学的に測定可能な酸化／還元電位を有する分子、をシグナル伝達要素として企図する。好ましい電気活性分子はメタロセンである。本発明に記載の電気活性シグナル伝達要素として作動することができるメタロセンは既知である。とりわけ好ましい電気活性分子の一例としては、フェロセンまたはフェロセン誘導体基、もしくはフェロセニルチオール（ $C_{55}H_{24}FeS$ ）のような誘導体を含むものが挙げられる；しかし、他の遷移金属の有機複合体もシグナル伝達要素として企図される。

#### 【0022】

本発明が化学的または生物学的作用物質の性質により限定されるということは意図しない。たとえば、タンパク質／タンパク質、タンパク質／ペプチド、抗体／抗原、抗体／ハプ

10

20

30

40

50

テン、酵素／基質、酵素／阻害剤、酵素／補因子、結合タンパク質／基質、キャリアタンパク質／基質、レクチン／炭水化物、受容体／ホルモン、受容体／エフェクター、核酸の相補的鎖、タンパク質／核酸、レプレッサー／インデューサー、リガンド／細胞表面受容体、ウイルス／リガンドなどのような、広範な作用物質およびそれらの作用物質の結合パートナーを本発明の結合相互作用のために使用することができる。一態様において、作用物質はリガンド、特にペプチドである。好ましい態様において、ペプチドは金属キレートに結合できる部分（たとえば、ヒスチジンタグ）により誘導体化される。この態様において、固体支持体が金属キレートを含み、そして先のペプチドが先の部分の先の金属キレートへの結合により、先の固体支持体に連結することは好都合である。

#### 【0023】

ある態様において、細胞表面受容体および細胞内シグナル伝達タンパク質をともに含む細胞由来分子は、事実上表面であるかまたは粒子様のいずれかであってもよい、固体支持体上にあるか、またはそれに連結している。これらの細胞由来タンパク質の結合パートナーは、既知および未知のリガンドの両方、ならびに推定薬物候補を含んでもよいものであるが、それらは表面および／または粒子様構造に連結し、そして2つの結合パートナー間の結合が生じるように、細胞由来タンパク質と相互作用させる。結合パートナーの一つまたはその連結支持体は検出可能な作用物質により付加的に誘導体化されてもよい。相互作用する複合体は、結合していない結合パートナーから結合した複合体を区別する結合複合体の特性を利用して同定される。共通の固体支持体上の結合パートナーの一つと共に固定化されるか、または直接結合パートナーの一つに連結した検出可能部分の存在、またはその変化が検出される。関連する相互作用を阻害する分子は、このシグナルの損失を検出することにより識別できる。相互作用するパートナーは、感知部分に結合パートナーの一つをとどめ、それに他の結合パートナーを補充する、または結合していない結合パートナーから結合した複合体を区別する、結合した複合体の特性を操作する、または結合パートナーの一つもしくはその連結固体支持体に補充可能な要素を連結する、ことによって感知装置に運ばれる。

#### 【0024】

たとえば、化学的または生物学的結合パートナーを固体支持体の表面に結合してもよく、その支持体は電極、一般的なバイオテクノロジーチップなどのような実質的に平面のアーティクルなどであってもよい。化学的または生物学的作用物質の結合パートナーはコロイドに結合してもよく、そしてアーティクルの表面にコロイドを暴露すると、結合パートナーが結合し、したがって表面にコロイドが固定化される。これは表面、具体的には表面の特定の部分でのコロイドの測定により測定することができる。コロイド粒子は、あるいははこの測定を容易にする補助的なシグナル伝達実体（たとえば、電気活性シグナル伝達実体または蛍光タグのような可視シグナル伝達実体）を含んでいてもよい。

#### 【0025】

具体的には、タンパク質のような細胞由来分子は、表面およびリガンドに連結し、同様に推定薬物候補は粒子に連結し、そして2つの結合パートナー間の結合が生じるように細胞由来タンパク質と相互作用する。結合パートナーの一つもしくはその連結支持体は検出可能な物質により誘導体化されてもよい。感知部分に結合パートナーの一つをとどめ、それに他の結合パートナーを補充することにより、相互作用するパートナーが感知装置に運ばれる。あるいは、結合パートナーの一つがシグナル伝達実体を表示することができるか、またはできない、補充可能な粒子に連結してもよい。本発明の一側面は、磁気材料を使用して電子的シグナル伝達実体を電極に補充することを伴う。この側面は、本発明の多くのアッセイおよび他の技術に用途を見出すことができる。典型的に、その方法において、シグナル伝達実体に磁気材料（磁気ビーズであってもよい）に関連して固定化される能力が提供される。磁気材料およびシグナル伝達実体は、本明細書に記載される各種化学的および／または物理的結合により、お互いに関連して固定化されてもよい。たとえば、第1の種が磁気材料に関連して固定化、もしくは固定されてもよく、そして第2の種がシグナル伝達実体に関して固定化もしくは固定されてもよく、または第1および第2の種がお互い

10

20

30

40

50

に結合してもよい。第1および第2の種は本質的に本明細書に記載されているか、または結合のための当技術分野で既知の任意の種であってもよく、一態様においてはタンパク質である。好ましい態様において、タンパク質は抗体ではないが、たとえば、リガンドおよびコグネイト受容体などである。シグナル伝達実体はコロイド粒子のような中間実体に固定されてもよく、結合パートナーとして作用するタンパク質の一つもそれに固定される。また、シグナル伝達実体は磁気材料を使用せずに電極に補充されてもよい。この手順において、シグナル伝達実体は電極に関する種の結合パートナーに関して、固定化されてもよく、結合パートナーはお互いに結合してもよい。本質的に、本明細書に記載、または当技術分野で既知の結合パートナー相互作用はこの技術を促進できる。

#### 【0026】

本発明の別の側面は、表面上のビオチン含有自己組織化単分子層を提供する。一態様において、表面はコロイド粒子の表面である。

本発明の他の利点、新規態様、および目的は、添付した図面（図式的であって、一定の比率で拡大して表すことを意図していない）に従って判断するとき、本発明の以下の詳細な説明から明らかになるであろう。図において、各種の図で説明されるそれぞれ同一か、またはほとんど同一の成分は、一つの数字で表される。分かり易くするために、当業者が本発明を理解するために説明が必要でない場合、すべての図のすべての成分を表示せず、本発明のそれぞれの態様のすべての成分も示さない。

#### 【0027】

##### 発明の詳細な説明

“Rapid and Sensitive Detection of Aberrant Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases” という表題で Bamdad et al., により 01/25/00 に出願された、国際特許出願番号第 PCT/US00/01997 号 (WO/00/43791 として 07/27/00 に公開)、“Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloid Structures” という表題で Bamdad et al., により 01/21/00 に出願された、国際特許出願番号第 PCT/US00/01504 号 (WO/00/34783 として 07/27/00 に公開)、“Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures” という表題で Bamdad et al., により 06/23/00 に出願された、一般的に所有される (commonly-owned)、同時係属中の米国特許出願番号第 09/602, 778 号; および “Rapid and Sensitive Detection of Protein Aggregation” という表題で Bamdad et al., により 08/03/00 に出願された、一般的に所有される (commonly-owned)、同時係属中の米国特許出願番号第 09/631, 818 号はすべて参照として本明細書に援用される。

#### 【0028】

定義:

本明細書で使用される“小分子”は、5キロダルトン未満、より具体的には1キロダルトン未満の分子を意味する。本明細書で使用される“小分子”は、タンパク質を除外する。

#### 【0029】

本明細書で使用される用語“候補薬物”はヒト、動物、または植物に使用されるいずれかの医薬品を表す。この定義内には、化合物類似体、天然に存在する物質、合成および組換え医薬品、ホルモン、抗菌剤、神経伝達作用物質などが包含される。これには、神経変性疾患、もしくは異常な凝集が特徴的な他の疾患の治療、またはその予防のための薬物としての使用を評価することになっているいずれかの作用物質または前駆体（天然に存在、合成または組換えのいずれか）が含まれる。本発明のスクリーニングアッセイのようなアッセイ中の活性によって、評価が行われる。

## 【0030】

本発明では多様な種類の粒子型が使用される。たとえば、“流体懸濁可能粒子”はそれ自体本発明のために使用される流体（一般に水溶液）中で懸濁液のままであることができるか、または磁場、電磁場、もしくは攪拌（stirring）、振とう、振動、超音波処理、遠心分離、攪拌（vortexing）のような攪拌（agitation）などの適用により、溶液中に維持できる粒子を意味する。“磁氣的に懸濁可能な”粒子は、磁場の適用により流体中で懸濁液として維持できるものである。電磁氣的に懸濁可能な粒子は、電磁場の適用により流体中で懸濁液として維持できるものである（たとえば、電荷を持つ粒子、または電荷を持つように修正した粒子）。“自己懸濁可能な粒子”は、たとえば磁場の補助なしに、少なくとも1時間、使用する流体（一般に水溶液）中で懸濁液のまま

10

## 【0031】

“タンパク質”および“ペプチド”は当技術分野で既知であり、そしてそれぞれが含むアミノ酸の数に関しては当技術分野で明確には定義されない。本明細書で使用されるこれらの用語は、当該技術分野におけるそれらの通常の意味で与えられる。一般に、ペプチドは100アミノ酸未満の長さのアミノ酸配列であるが、300アミノ酸までの配列を含むことができる。タンパク質は一般に少なくとも100アミノ酸の分子であると考えられる。

## 【0032】

本明細書で使用される“金属結合タグ”は、キレートに配位結合した金属に固定されていてもよい分子の群を表す。そのような分子の適切な基は、ヒスチジンおよびシステインを含むが、それらに限定されないアミノ酸配列（ポリアミノ酸タグ）を含む。金属結合タグは以下に定義される、ヒスチジンタグを含む。

20

## 【0033】

本明細書で使用される、“金属を配位結合しているキレート”またはキレートにより配位結合される金属は、キレート剤により配位結合される金属を表し、そのキレート剤は金属上のすべての利用可能な配位結合部位を満たさず、金属結合タグによる結合に利用できるようにいくつかの配位結合部位を残している。

## 【0034】

本明細書で使用される、“金属結合タグ／金属／キレート結合”は、第1および第2の種類の結合を定義し、そこでは第1の種は金属結合タグに関して固定化され、そして第2の種はキレートに関して固定化され、ここでキレートは金属を配位結合し、そこに金属結合タグも配位結合する。参照として本明細書に援用されるBamdade et al., の米国特許第5,620,850号は例示的な結合を記載する。

30

## 【0035】

“シグナル伝達実体”は、その存在を具体的な試料中または具体的な部位で示すことができる実体を意味する。本発明のシグナル伝達実体は、ヒト裸眼で同定可能なもの、分離すると目に見えなくてもよいが、もし十分な量（たとえば、コロイド粒子）があればヒト裸眼で検出できるもの、可視的に（裸眼または電子顕微鏡などを含む顕微鏡により）、または分光学的に容易に検出できるようなレベル、または波長範囲内で電磁放射を吸収または放射する実体、適切な活性化エネルギーに暴露すると特徴的な酸化／還元パターンを示す酸化還元・活性分子のような、電子的または電気化学的に検出することができる実体（“電子的シグナル伝達実体”）などであってもよい。例としては、染料、色素、酸化還元・活性分子のような電気活性分子、蛍光部分（定義上は、蛍光性の部分を含む）、アップレギュレートしている蛍光体、化学ルミネセンス実体、電気化学ルミネセンス実体、またはホスラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む酵素結合シグナル伝達部分が挙げられる。“シグナル伝達実体の前駆体”は、それ自体はシグナル伝達能力を持たなくてもよいが、他の種と化学的、電気化学的、電氣的、磁氣的、または物理的相互作用をするときにシグナル伝達実体になる実体である。例としては、他の分子と化

40

50

学的相互作用をするときのみ、特定の、検出可能な波長内で放射する能力を有する発色団が挙げられる。シグナル伝達実体の前駆体は、本明細書で使用される“シグナル伝達実体”と区別することができるが、その定義内に含まれる。

#### 【0036】

本明細書で使用される、他の種またはアーティクルの表面に関して種が“固定された、または固定されるように適合した”とは、種が共有結合的連結、特異的な生物学的結合（たとえば、ビオチン／ストレプトアビジン）による連結、キレート／金属結合のような配位結合などにより、化学的にまたは生物学的に結合することを意味する。たとえば、このような状況で“固定された”ものには、ポリスチレンビーズ上で合成されたペプチドのような結合種、ビーズに共有結合的に連結したプロテインAのようなタンパク質に結合する抗体に特異的に生物学的に結合した結合種、GSTやPhageのような分子の部分（遺伝的設計により）形成する結合種であってそれらは同様に表面に共有結合的に固定した結合パートナーに特異的に生物学的に結合するもの（たとえば、GSTの場合はグルタチオン）など、を含むがそれらに限定されない複数の化学的結合、複数の化学的／生物学的結合などが含まれる。別の例としては、チオールに共有結合する部分は金表面に固定されるように適合する、なぜなら、チオールは金に共有結合するからである。同様に、金属結合タグを持つ種は、表面に共有結合（チオール／金結合）する分子であって金属を配意結合しているキレートをも有する分子を持つ表面に固定されるように適合する。もし、表面が特定のヌクレオチド配列を持ち、そして種が相補的なヌクレオチド配列を含むならば、種は同様に表面に固定されるように適合する。

10

20

#### 【0037】

“共有結合的に固定される”とは、1以上の共有結合により固定されることを意味する。たとえば、同様に金表面に固定されるカルボキシレート-提示アルキルチオールにEDC/NHS化学により共有結合した種は、その表面に共有結合的に固定される。

#### 【0038】

本明細書で使用される、他の成分“に関して固定化される”成分は、他の成分に固定されるか、または、たとえば他の成分が同様に固定される第3の成分に固定されることにより、他の成分に間接的に固定されるかのいずれかであるか、またはさもなければ他の成分と翻訳的に（translationally）関連する。たとえば、シグナル伝達実体が結合種に関して固定される、結合種が固定されるコロイド粒子に固定される、結合種が固定されるデンドリマーまたはポリマーに固定される、などの場合、シグナル伝達実体は結合種に関して固定化される。第1のコロイド粒子の表面に固定された種が実体に結合し、そして第2のコロイド粒子の表面上の種が同じ実体に結合し、ここで実体は単一の実体、複数の種の複合実体、細胞、別の粒子などであってもよい場合は、コロイド粒子は他のコロイド粒子に関して固定化される。本発明の他の実体に固定されるか、または固定されるように適合することが可能なすべての実体もまた、他の実体に固定化されるか、または固定化されるように適合することが可能であり、逆の場合も同じである。

30

#### 【0039】

“特異的に固定される”または“特異的に固定されるように適合する”とは、定義“固定される、または固定されるように適合する”の定義に関して先に記載のように、種が別の試料または表面に化学的または生化学的に結合することを意味するが、すべての非特異的結合を除外する。

40

#### 【0040】

本明細書で使用される“非特異的結合”は、生化学の分野での通常の意味が与えられる。本明細書で使用される“コロイド”は、ナノ粒子、すなわち、無機、ポリマー性、および金属粒子を含む、非常に小さく自己懸濁可能な粒子を意味する。典型的には、コロイド粒子は、すべての次元の断面が250nm未満、より典型的にはすべての次元の断面が100nm未満、そして好ましくは10～30nmのものであり、そして金属、非金属、結晶質または非晶質であってもよい。本明細書で使用されるように、この用語は生化学の分野で一般に使用される定義を含み、そしてそれは典型的には金コロイド粒子を意味する。

50

## 【0041】

本明細書で使用される、“金属に配位結合することができる部分”は、金属結合タグまたはキレートのような、金属原子上の少なくとも2つの配位結合部位を占有することができるいずれかの分子を意味する。

## 【0042】

“多様な生物学的種”は、マウスおよびハムスター、マウスおよびヤギなどを意味する。用語“試料”は以下のものを含むがそれらに限定されない、好都合には本発明に従って評価することができる、生物学的供給源（“生物学的試料”）またはいずれか他の生物学的もしくは非生物学的媒体由来のいずれかの細胞、組織、もしくは流体を表す：ヒト患者から採取される生物学的試料、動物から採取される試料、ヒトの消費食物から採取した試料、家畜飼料のような動物の消費食物を含む試料、ミルク、寄贈された臓器試料、血液供給用の血液の試料、水供給用の試料など。試料の一例として、候補薬物の抗力を測定するために、その薬物を投与されたヒトまたは動物から採取された試料がある。

10

## 【0043】

特定の成分を“含むと推測される試料”は、成分の量が未知である試料を意味する。たとえば、神経変性疾患または非-神経変性疾患のような疾患を有すると推定されるが、疾患を有することが既知でないヒト由来の流体試料は、神経変性疾患凝集体-形成種を包含すると推定される試料を定義する。これに関連した“試料”には、ヒトまたは動物由来の生理的試料、食物由来の試料、家畜飼料などの天然に存在する試料が、ならびに“予め構造が決定された試料”は、その化学的または生物学的配列または構造が、神経変性疾患のような具体的な過程と関連するか否かを試験するためのアッセイで使用される試料を意味すると本明細書で定義される。たとえば、“予め構造が決定された試料”にはペプチド配列、ファージディスプレイライブラリー中の任意のペプチド配列などが挙げられる。ヒトまたは他の動物から採取される代表的な試料には、細胞、血液、尿、眼水、唾液、脳脊髄液、または扁桃腺、リンパ節、針生検由来の流体または他の試料などが挙げられる。

20

## 【0044】

本明細書で使用される“金属結合タグ”は、キレートに配位結合した金属に結合することができる1群の分子を表す。そのような分子の適切な群には、典型的には約2から約10アミノ酸残基までのアミノ酸配列が含まれる。これらには、ヒスチジンおよびシステイン（“ポリアミノ酸タグ”）が含まれるが、それらに限定されない。そのような結合タグは、それらがヒスチジンを含むとき、“ポリ-ヒスチジントラクト”または“ヒスチジンタグ”もしくは“HIS-タグ”と呼んでもよく、アミノ-もしくはカルボキシ-末端のいずれか、またはペプチドもしくはタンパク質または核酸の、任意の露出領域に存在してもよい。6から10残基までのポリ-ヒスチジントラクトが本発明の使用には好ましい。また、ポリ-ヒスチジントラクトは関心のあるタンパク質に添加される多数の連続したヒスチジン残基であるとして機能的に定義され、それらは金属キレートカラム上で得られたタンパク質の親和性精製、または他の分子（たとえば、HIS-タグと反応する抗体）との相互作用によりタンパク質末端の同定をすることができる。

30

## 【0045】

“親和性タグ”は当技術分野で通常の意味が与えられる。親和性タグには、たとえば、金属結合タグ、GST（GST/グルタチオン結合クリップ中にある）、およびストレプトアビジン（ビオチン/ストレプトアビジン結合中にある）が挙げられる。本明細書の各部分で、結合相互作用と関連して特異的親和性タグについて記載する。親和性タグを使用するいずれかの態様において、本発明は本明細書に記載されたいずれかの親和性タグからの選択をそれぞれ含む、一連の個々の態様を含むということを理解すべきである。

40

## 【0046】

本明細書で使用される“分子ワイヤ”は、SAMで被覆した電極と接触する流体が電極と電氣的に連絡するための能力を高めるワイヤを意味する。これには、伝導性分子、または先に記載し、そして以下でより詳細に例示する、SAM中に電極と連絡するための欠陥を生じることができる分子が挙げられる。付加的な分子ワイヤの非限定的なリストには、2

50

ーメルカプトピリジン、2ーメルカプトベンゾチアゾール、ジチオスレイトール、1, 2ーベンゼンジチオール、1, 2ーベンゼンジメタンチオール、ベンゼン-エタンチオール、および2ーメルカプトエチルエーテルが挙げられる。また、電極の平面で伝導性を促進する分子の添加により単分子層の伝導性を高めることができる。伝導性SAMは、以下のものから構成できるが、それらに限定されない：1) 硫黄で停止するポリ(エチニルフェニル)鎖；2) ベンゼン環で停止するアルキルチオール；3) DNA塩基で停止するアルキルチオール；4) 単分子層中に不十分に詰まる、いずれかの硫黄停止種；5) 上記の全てに非特異的吸着を阻害するエチレングリコール単位またはメチル基のいずれかで停止するアルキルチオール Spacer 分子を足したものまたは引いたもの。チオールは金に親和性があるためにSAMの容易な形成において記載される。米国特許第5, 620, 820号および他の参考文献に基づいて、チオールを当技術分野で既知の他の分子と置換してもよい。分子ワイヤは典型的に、それらのかさおよび他の形状のために、他の点では強く詰まったSAM中に欠陥を作り、SAMが暴露される流体に対して表面がしっかり密閉されるのを妨げる。分子ワイヤは強く詰まった自己組織化構造の破壊を引き起こし、それによって表面が暴露される流体が表面と電氣的に連絡できる欠陥を定義する。これに関連して、流体は表面に接触することにより、またはトンネル効果などにより電氣的連絡が起こり得る表面の近傍に十分に接近することにより、表面と電氣的に連絡する。

#### 【0047】

“生物学的結合”という用語はお互いの親和性または結合能力を表す、対応する分子対間の相互作用、典型的には生化学的、物理学的、および／または薬劑的相互作用を含む特異的もしくは非特異的結合または相互作用である。生物学的結合は、タンパク質、核酸、糖タンパク質、炭水化物、ホルモンなどを含む分子対間で起こる相互作用の型を定義する。具体的な例としては、抗体／抗原、抗体／ハプテン、酵素／基質、酵素／阻害剤、酵素／補因子、結合タンパク質／基質、キャリアタンパク質／基質、レクチン／炭水化物、受容体／ホルモン、受容体／エフェクター、核酸の相補的鎖、タンパク質／核酸、レプレッサー／インデューサー、リガンド／細胞表面受容体、ウイルス／リガンドなどが挙げられる。

#### 【0048】

“結合パートナー”という用語は、特定の分子と結合することができる分子を表す。生物学的結合パートナーは、その例である。たとえば、プロテインAは生物学的分子IgGの結合パートナーであり、逆も同様である。

#### 【0049】

“測定する”という用語は、たとえば、分光法、偏光解析法、圧電測定法、イムノアッセイ、電気化学的測定法などによる、種の定量的、または定性的分析を表す。また、“測定する”は、たとえば2つの種間の結合の検出のように、種間の相互作用を検出または定量することも意味する。

#### 【0050】

“自己組織化単分子層”(SAM)という用語は、自発的に表面に化学吸着される分子の比較的整った集合を表し、そこでは分子はお互いにほぼ平行で、表面にだいたい垂直に配置される。分子のそれぞれは、表面に接着する官能基、および単分子層中で比較的整ったアレイを形成するために隣接する分子と相互作用する部分を含む。Laibinis, P. E. ; Hickman, J. ; Wrighton, M. S. ; Whitesides, G. M. Science 245, 845 (1989)、Bain, C. ; Evall, J. ; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. 111, 7155-7164 (1989)、Bain, C. ; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. 111, 7164-7175 (1989)を参照されたい、それらはそれぞれ、参照として本明細書に援用される。

#### 【0051】

“自己組織化混合単分子層”という用語は、不均一の自己組織化単分子層、すなわち、少なくとも2つの異なる分子の比較的整った集合から作られる単分子層を表す。



## 【0052】

一側面において、本発明は分析、薬物スクリーニングなどのための化学的または生物学的作用物質間の相互作用を企図する。本発明は無傷細胞（電極上で増殖するか、または溶液中もしくは懸濁液中にある）上のリガンドを含むが、それらに限定されないリガンド相互作用を分析する、および／または阻害することを含むが、それらに限定されない。本発明は、薬物候補、既知または推定リガンド、および小分子薬物ライブラリーの使用を含む各種態様を企図する。

## 【0053】

一態様において、細胞は自己組織化単分子層（SAMs）により誘導体化されてもよいが、またはされなくてもよい電極上で増殖する。推定リガンド（たとえば、特定の細胞表面受容体の）は、固体支持体（たとえば、金コロイド）上でシグナル伝達要素（たとえば、電気活性複合体）と一緒に固定化される。これらの誘導体化された固体支持体は、感知電極（たとえば、金属支持体）上に固定化された細胞と共にインキュベートされる。標的受容体と固体支持体上のリガンド（例えば、コロイドに結合したリガンド）間の相互作用は共固定化されたシグナル伝達要素を感知電極近くにつなぎ止める。いずれか具体的な機序に限定されないが、電位が電極に適用されると、近くの酸化還元 - 活性金属複合体がそれらの特徴的な酸化電位を受け、電子を放出すると考えられる。振動成分がボルテジランプの上端に添加されるとき、それぞれの金属複合体により多くの電子が放出され、電流出力として検出することができる。この種の電気化学的分析の形状は、交流ボルタンメトリー（ACV）と呼ばれる。当業者には知られているように、本明細書で使用される“細胞表面受容体”は、細胞表面タンパク質をも包含する総称的用語である。

## 【0054】

本発明のある態様は、コロイド粒子の表面のような表面上の自己組織化単分子層（SAMs）、およびSAMsで被覆された表面を有するコロイド粒子のようなアーティクルを使用する。好ましい態様の1セットにおいて、完全に合成分子から形成されたSAMsは、表面または表面の領域を完全に被覆する、たとえばコロイド粒子の表面を完全に被覆する。ここでの“合成分子”は、天然に存在しない分子、どちらかといえば、ヒトの指示、またはヒトにより考案されるか、もしくはヒトにより指示された制御下で合成されたものを意味する。ここでの“完全に被覆する”は、SAMによる完全で直接的な被覆を妨害する、タンパク質、抗体、または他の種と直接接触する表面の部分または領域がないことを意味する。すなわち好ましい態様において、表面または領域はその全体にわたり、完全に天然に存在しない分子（すなわち合成分子）からなるSAMを含む。SAMは、表面で堅く詰まったSAMsを形成するSAM形成種、または分子ワイヤと組み合わせたこれらの種、もしくはSAMを通して電気的連絡を促進することができる他の種（SAMに関与可能な欠陥促進種を含む）、もしくはSAMに関与可能な他の種、およびこれらのいずれかの組合せから構成されてもよい。好ましくは、SAMに関与する種のすべては、金表面に共有結合的に結合するチオールのような、表面に結合する、場合によっては共有結合する官能基を含む。本発明の表面上の自己組織化単分子層は、いずれかの化学的または生物学的官能基を本質的に提示（露出）することができる種（たとえば、金が表面のときのチオール種）の混合物からなっていてよい。たとえば、それらは非特異的吸着を阻害するためのトリ - エチレングリコール - 停止種（たとえば、トリ - エチレングリコール停止チオール）、および、たとえばニッケル原子との複合体であるとき、ヒスチジンタグ標識結合種のような金属結合タグ標識種を捕捉するニトリロトリ酢酸のような金属を配位結合することができるキレートで停止するような、親和性タグの結合パートナーで停止する他の種（たとえば、チオール）を含んでいてよい。本発明は、コロイド表面、またはいずれか他の表面上に提示された本質的に任意の化学的または生物学的種の濃度を厳密に管理する方法を提供する。本発明の多くの態様において、自己組織化単分子層は金コロイド表面上に形成される。本発明は、コロイド表面上に提示されたヒスチジンタグ標識ペプチドの濃度を厳密に管理する方法を提供する。それぞれのコロイド表面上のペプチド密度についての厳密な管理をしないと、共固定化されたペプチドはお互いに容易に凝集して微小疎水性領域を

10

20

30

40

50

形成し、試料中に存在する凝集物形成種の非存在下でコロイド-コロイド凝集を触媒するであろう。これは既存のコロイド凝集アッセイに優る、本発明の利点である。

#### 【0055】

本発明に記載の方法は、BSAによるブロッキングのような、タンパク質ブロッキング工程なしに、非特異的吸着に抵抗するコロイド上の自己組織化単分子層を生成する。また、本発明に記載の方法は、生物学的に適切な流体中で安定であり、および、結合反応を妨害する界面活性剤（安定性のため；コロイドを懸濁液中に維持する）を必要としない誘導体化コロイドを生じる。これにより、溶液中で感度の高い結合アッセイを行うことができる。このことは、既存のコロイド凝集アッセイでは一般的な、吸着表面に接着する結合パートナーを持つ必要性を除外する。以下で説明するように、好都合には界面活性剤はコロイド上でのSAM形成に使用することができる。この場合、界面活性剤はSAM形成後に除去してもよく、好ましくは除去し、結合相互作用、もしくはコロイドの他の使用中にコロイド上、SAM中、またはどこか他にはもはや存在しない。

10

#### 【0056】

本発明は、細胞が金属支持体（たとえば、電極）に直接結合する態様に限定されることを意図しない。態様は、細胞が金属支持体に連結したリガンドの相互作用により、細胞が間接的に結合することを企図する。すなわち、特異的または非特異的相互作用により、直接的または間接的に細胞に結合する分子で表面を被覆することにより、細胞を表面に補充することができる。たとえば、メチル-停止自己組織化単分子層（SAMs）は非特異的にコラーゲンに結合し、その後非特異的に細胞に結合する。あるいは、アルギニン、グリシン、アスパルテート（RGD）モチーフを含むペプチドはビトロネクチンを模倣し、内皮細胞のような特定の細胞型に結合する。同様に、ポリリジン、正荷電、Kringledメイン、インテグリン、およびペプチド、またはそれらの分子模倣物は細胞を連結するために表面に結合することができる。これらのリガンドは、SAMsへの取り込みにより、表面上に表示されてもよい。リガンド自体はSAMに直接取り込まれる必要はない。リガンドに連結した親和性タグの結合パートナーを提示するSAMを使用してもよい。たとえば、ヒスチジンタグにより修飾されたペプチドは、ニトリロトリ酢酸（NTA）-ニッケルチオールを含むSAMsに容易に結合することができる。あるいは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質はグルタチオンまたはその誘導体を取り込むSAMに連結してもよい。金属電極を使用することの1つの利点は、表面にSAMを形成する分子の末端に多くの既知の官能基を提供できることである。

20

30

#### 【0057】

たとえば、溶液中の細胞は、電気泳動により検出電極に連結することができる。具体的には、細胞由来分子は、結合複合体の検出を補助するための、フェロセン誘導体のような電気活性分子も提示するコロイドに連結したリガンドに結合してもよい。しかし、使用される検出要素は、容易に検出可能な、いずれかに荷電した電気活性種もしくは蛍光タグ、またはコロイドそれ自体であってもよい。

#### 【0058】

シグナル伝達実体は、本発明の各種アッセイおよび手順に使用される。染料、色素、電気活性分子、蛍光部分、アップレギュレートしている蛍光体、ホースラディッシュペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む酵素結合シグナル伝達部分、化学ルミネッセンス部分、電気化学ルミネッセンス部分、などを含む、任意の各種シグナル伝達実体がそれぞれの場において選択されてよいということを理解すべきである。Knight, "Trends in Analytical Chemistry", vol. 18, 1999, pg. 47; Knight, et al., Analyst, vol. 119, 1994, page 879; Stults, et al., "Use of Recombinant Biotinylated Aequorin in Microtiter and Membrane-Based Assays: Purification of Recombinant Apoaequorin from *Escheria coli*", Biochemistry, 1992, 31, 1433; Men

40

50

geling, et al., "A Microplate Assay for Analysis for Solution-Phase Glycosyltransferase Reactions: Determination of Kinetic Constants", Analytical Biochemistry, 119, 286, (1991) を例として参照されたい。所望する場合には、各種シグナル伝達実体はビーズまたはコロイド粒子のような粒子の表面に関して固定化されてもよい。これらのいずれかに提示されたシグナル伝達実体は蛍光分子であってもよい。緑色蛍光タンパク質を含む、蛍光剤が結合した抗体および他の蛍光剤融合タンパク質は生物医学的研究および試験に広く使用される。これらの蛍光タンパク質および分子は、親和性タグ、EDC/NHS 化学によるか、または本発明に記載の NT A-S A M-被覆コロイド上に提示された His-タグ標識プロテイン A または G への結合によるか、のいずれかにより、推定結合パートナーをも提示する金コロイドに容易に連結することができる。また、蛍光部分のようなシグナル伝達実体はビオチン停止リガンドによりコロイド上に共固定化されてもよい、またはキレート/金属/金属結合タグ結合により固定されてもよい。また、蛍光部分はそれを抗体に練得 k つし、そして抗体に結合するための His-プロテイン G とともにキレート/金属/金属結合タグを使用することにより、固定されてもよい。上記部分はその後直接検出することができる。

#### 【0059】

リガンド誘導体化コロイドは、自己組織化単分子層 (S A M) により修飾されても、されなくてもよい電極の近くにつなぎ止めてもよく、結合により誘発された電極電流中の摂動により結合細胞を検出することができる。細胞由来タンパク質は、磁気ビーズに連結したリガンドに結合することもできる。あるいは、細胞由来タンパク質は電気活性デンドリマー上のリガンドに結合することもできる。さらに細胞由来タンパク質は、電気活性または酸化還元-活性複合体も提示するポリマーに連結したリガンドに結合することができる。細胞由来タンパク質は、同様に電気活性または酸化還元-活性複合体を提示する伝導性ポリマーに連結したリガンドに結合することができる。

#### 【0060】

代わりとなるスキームにおいて、記載の系は 2 つの異なるリガンドを使用することができる。構成的に発現された細胞表面受容体に結合する 1 つのリガンドは、磁気ビーズ上に固定化され、感知電極に細胞を補充するために使用することができる。関心のある細胞表面受容体を認識する 2 番目のリガンドは、シグナル伝達コロイドに結合する。

#### 【0061】

別の代わりとなるスキームにおいて、記載の系は異なる電位で酸化する 2 つのフェロセン誘導体のような、2 つの識別可能な電気活性複合体を使用することができる。第 1 のフェロセン誘導体は関心のある細胞表面受容体のリガンドに直接的または間接的に連結することができる。第 2 のフェロセン誘導体は、構成的に発現された細胞表面受容体に結合する第 2 のリガンドに直接的または間接的に連結する。この手段では、2 つのシグナルの比は発現の生理学的、環境的、または疾患に関連した変化により誘導される細胞由来分子 (たとえば、タンパク質) の誘導のレベルをキャリブレーションするために使用することができる。この発現比の比較は、同じ金属複合体を持つ両リガンドを有するものについても行うことができるが、異なる電極パッド上で試料の異なるアリコートを実行する。

#### 【0062】

本発明は、粒子様でもよい表面へのリガンド (推定薬物候補を含むが、それらに限定されない) の連結をし、およびそれらを、支持体に連結するか、または細胞上でそのままにしておいてもよいたとえば細胞表面タンパク質などの細胞由来タンパク質を、結合パートナーの同定、それらの存在または非存在の測定、およびそれらのレベルの定量のために、相互作用させることを企図する。具体的には、細胞表面受容体を提示する無傷細胞を第 1 結合パートナーとして使用することができる。シグナル伝達実体に直接的または間接的に結合した既知、または推定のリガンドは、第 2 結合パートナーとして作用する。あるいは、

細胞由来タンパク質は表面、およびそれらのリガンド、またはコロイドまたは誘導体化コロイドのような、シグナル伝達能力を有する粒子に連結した結合パートナーに結合することができる。薬物候補は相互作用を阻害することで薬物スクリーニングを容易にするために添加することができる。この方法は、診断にも非常に有用である。タンパク質または抗体は表面に固定化されてもよく、そしてこのタンパク質の結合パートナーを含むと推測される試料は、結合を促進するために試料と共にインキュベートしてもよく、そして試料の残りは洗い流すことができる。結合パートナーに対するリガンドをおよびシグナル伝達能力を有する粒子が添加されてもよい。試料が結合パートナーを含有する場合には、その粒子は表面に間接的に結合してシグナルを与えるであろう。表面は補充可能な粒子であってもよい。連結は直接的または間接的であってもよく、すなわち、連結はお互いに固定化される2つの実体に関連していてもよい。粒子は、固定化された抗体、たとえば抗体が結合するヒスチジンタグ標識プロテインG、およびその抗体は共通のリガンドを認識してもよい、またはお互いに認識するタンパク質を含んでいてもよいものを提示してもよい。

10

## 【0063】

本発明の1つの一般的な技術は、結合パートナーによる結合部分（生物学的または化学的作用物質）の捕捉を示す電極の表面に、電子的または電気化学的シグナル伝達実体を補充するための磁気ビーズを使用することを伴う。図27では、第1の種30が、メタロセンフェロセン、34のようなシグナル伝達能力をも有するコロイド粒子32に連結される。30の結合パートナーと推測される第2の種36は、磁気粒子38に連結し、38はシグナル伝達ができないが、電極40に磁氣的に引き寄せられることができる。とりわけ有用な1技術において、種30および第2の種36はタンパク質であり、したがって本発明はプロテオミクスの分野に具体的な用途を見出す。上記技術は、コロイド粒子32に非コロイド構造、磁気ビーズ、38に固定できるようにすることを伴う、本発明の側面の一例である。コロイド粒子の非コロイド構造への固定の測定は、磁気ビーズを電極に引き寄せ、コロイド粒子も電極の近くにあるか、または連結していないかを測定することにより行われる。具体的には、2つの成分を溶液中で一緒にインキュベートし、得られた複合体を磁氣的に電極に引き寄せる。電極は、その後交流ボルタンメトリー（ACV）により分析する（Laviron E: J Electro Anal Chem., 1979, 105: 35）。電流は電位の関数として、リアルタイムでプロットされる。第1成分上の電子的または電気化学的シグナル伝達部分が電極に非常に接近した場合、特徴的な電位において明確な電流ピークが発生するであろう。2つのタンパク質がお互いに相互作用し、磁気粒子が感知電極に引き寄せられる場合、それはシグナル伝達能力を持つコロイド粒子をも持つであろう。第1成分は小さい金コロイドであるため、コロイド粒子上の第1の種と磁気粒子に結合した第2の種間の相互作用により、感知電極に特異的に補充されない限り、懸濁液中に残ったままである。シグナル伝達粒子が第1の種と第2の種間の相互作用により磁気ビーズに結合している場合にのみ、電子的または電気化学的シグナルが発生するであろう。この態様において、コロイド粒子はフェロセンに例示されるような、補助的なシグナル伝達実体を含む。以下に記載の他の態様において、コロイド粒子はそれ自体シグナル伝達実体であり、補助的な実体を必要としない。

20

30

## 【0064】

この研究方法は、アレイフォーマット中のタンパク質-タンパク質相互作用の迅速なスクリーニングに使用してもよい。潜在的な治療標的を探索する場合、研究者は特定のタンパク質の結合パートナーを同定することをしばしば必要とする。既知のタンパク質は磁気ビーズに結合することができる。これは、化学的官能基を提示する市販の磁気ビーズへの既知のタンパク質の直接的化学的カップリングにより、コグネイト抗体を介してプロテインA被覆磁気ビーズへの連結により、またはNTA-SAMにより誘導体化されている金被覆磁気ビーズへヒスチジンタグ標識した既知のタンパク質を連結することにより行うことができる（たとえば、本明細書に参照として援用される米国特許第5,620,850号を参照されたい）。潜在的な結合パートナーは、ヒスチジンタグ標識タンパク質として発現され、その後フェロセン部分も提示するNTA-SAM被覆コロイドに別々に結合して

40

50

もよい。電極アレイに接続したマルチウェルアレイのそれぞれのウェルは、磁気ビーズ上の既知のタンパク質を含むであろう。シグナル伝達コロイドに連結した別個の推定結合パートナーは各ウェルに別々に添加されてもよい。次にどの候補タンパク質が既知のタンパク質に結合したかを調べるために、得られた複合体を電極に磁氣的に引き寄せてもよい。既知の種は必ずしもタンパク質である必要はない。結合パートナーが同定されたとき、相互作用を阻害するために薬物候補をアッセイに添加してもよい。

#### 【0065】

あるいは、生物学的または化学的作用物質30は薬物候補であり、その結合パートナー（潜在的な結合パートナー）36は薬物候補の標的であるか、または逆である。具体的には、医学的に適切な標的種に結合する薬物候補を同定するために薬物候補が磁気粒子に連結し、および既知のタンパク質がシグナル伝達コロイドに結合してよい。あるいは、種30および36は、それぞれ、標的および標的に対するリガンドであってもよく、そして技術はコロイド32および磁気ビーズ38を近づけ、標的へのリガンドの結合を阻害する候補薬物の存在下で30を36に結合させることに伴ってもよい。以下で理解されるように、この技術はコロイドと各種非コロイド構造との相互作用に適用することができる。

10

#### 【0066】

ELISA、蛍光標識およびSPRのような既存の方法に優るこの技術の利点としては以下のことが挙げられる：この系では、タンパク質標識の必要性がない；タンパク質は標識された成分に結合する。金コロイドは以下の両方により前もって標識することができる：a) シグナル伝達部分；およびb) タンパク質連結のための官能基。ヒスチジンタグ標識タンパク質を捕捉するためのNTA/ $\text{Ni}^{2+}$ 、および電子的または電気化学的シグナル伝達のためのフェロセン誘導体を共に提示する自己組織化単分子層はコロイド上に形成されてもよい。非修飾タンパク質の化学的カップリング（標準EDC/NHS化学）のためのカルボン酸基を包含するSAMsも使用することができる。技術はモジュール方式である。実質的にいずれの生物学的種もシグナル伝達実体を有するコロイド上に共固定化することができる。当該技術は微小電極アレイ上で容易に多重化できるため、費用効率のよい多重化を可能にする。

20

#### 【0067】

リボソームも第1の結合パートナー30を取り込むことができる。上記のように、シグナル伝達自体がリボソームに取り込まれてもよい、またはリボソーム形成後にHisタグ標識可溶性受容体を捕捉するために脂質がリボソームに取り込まれてもよい。リボソームは、安定性を増加させるために、リボソーム形成後にUVに活性化される交差結合をする、光励起性基を含有することができる。

30

#### 【0068】

また、薬物候補の同定は競合的阻害アッセイを使用することにより行うことができる。具体的には、溶液中の遊離薬物候補を別々に組成物と一緒にインキュベートすることができる。受容体またはリガンドに結合した薬物により生じる標的細胞由来タンパク質に対する競合的阻害は、検出シグナルの時間または投与量依存的損失として表すことができる。

#### 【0069】

これを行うには、シグナル伝達部分を既知のリガンドに直接的に、または間接的に結合する方法を必要とし、そしてその後複合体結合パートナーを感知表面に連結または補充する方法が提供される。前者は先に記載され、後者は以下に記載される。

40

#### 【0070】

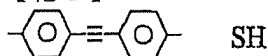
使用される感知表面は各種の形状であってよい。しかし、説明のために、伝導性SAMにより修飾される電極を使用する、結合パートナー複合体を補充するための方法が記載される。伝導性SAMは、金属表面に結合した分子の層であり、その表面は飽和アルキルチオレートのような絶縁種により均一に被覆された金属より速い速度で電子を伝導させる。電子伝導のための好ましい経路は、分子ワイヤ（芳香環化合物のポリマー）が取り込まれている単分子層により提供することができる。本明細書にMF1として表される、ポリ（エチニルフェニルチオール）（すなわち、 $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{S}$ ）を含むがそれらに限定されない

50

、各種の分子をこの目的に使用することができる：

【0071】

【化1】



【0072】

本明細書で使用する“分子ワイヤ”は、SAMで被覆した電極と接触している流体が電極と電氣的に連絡する能力を高めるワイヤを意味する。これには、先に記載し、以下でさらに完全に例示する伝導性分子、または流体が電極と接触するようにSAM中に欠陥を生じることができる分子が含まれる。付加的な分子ワイヤの非限定的なリストには、2-メルカプトピリジン、2-メルカプトベンゾチアゾール、ジチオスレイトール、1, 2-ベンゼンジチオール、1, 2-ベンゼンジメタンチオール、ベンゼン-エタンチオール、および2-メルカプトエチルエーテルが挙げられる。また、単分子層の伝導性は電極の平面で伝導性を促進する分子の添加により高めることが可能である。伝導性SAMは、以下のものからなるが、それらに限定されない：1) 硫黄で停止するポリ(エチニルフェニル)鎖；2) ベンゼン環で停止するアルキルチオール；3) DNA塩基で停止するアルキルチオール；4) 単分子層中に不完全に詰まる、いずれかの硫黄停止種；5) 上記の全てに非特異的吸着を阻害するエチレングリコール単位またはメチル基のいずれかで停止するアルキルチオールスペーサー分子を足したものまたは引いたもの。チオールはSAMの即座の形成において、それらの金への親和性のために記載される。米国特許第5, 620, 820号および他の参考文献に基づいて、チオールを当技術分野で既知の他の分子と置換してもよい。

【0073】

シグナル伝達コロイド上の既知のリガンドがそれらのコグネイト細胞由来タンパク質と相互作用するとき、薬物候補を溶液に添加し、異なる作用をモニターしてもよい。細胞に直接的に、または間接的に結合する頭基で停止する分子(たとえば、メチル基、ポリK、陽性電荷、RGD配列、Kringlesモチーフ、インテグリン、およびそれらのペプチド模倣物)も提示する伝導性SAMにより被覆された電極に細胞が補充されてもよい。あるいは異なる相互作用は、伝導性SAM上に提示されたコグネイトリガンドと相互作用している、SAMに結合した細胞表面タンパク質を有することにより定量することができる。この場合、リガンドが構成的に発現された受容体に結合した後、電子的または電気化学的シグナルが生成される。流動力下では、電子的または電気化学的シグナルはSAM固定化リガンドと相互作用する細胞表面受容体の数に比例するだろう。流速の関数としての細胞運動性の速度は、表面の細胞接着分子に対する受容体の密度を示す。相互に作用するSAMの下流は、電荷読みとり装置(たとえば、電流計、電荷計数装置)、または光学式読みとり機(たとえば、表面プラズモン共鳴検出器、または蛍光読みとり機)である。さらに、これらの方法は、関与する特異的な受容体-接着分子相互作用の予備知識なしに、浸潤または転移が特徴であることが既知の細胞表現型を阻害する薬物のスクリーニングに使用することもできる。また、生理学的に適切な相互作用を模倣する薬物のスクリーニングはこの系を使用して以下のいずれかにより行うことができる：溶液中に遊離で薬物候補を添加し、検出シグナルの損失を探索するか、または固体支持体上の薬物候補と共に溶液中で遊離した既知のリガンドを添加し、検出シグナルの出現を探索する。

【0074】

わずかに陽性のバイアスをAC電位ランプ(ramp)に適用すると細胞は陰性荷電されるという事実から、感知電極に引き寄せられる。リガンドが連結するデンドリマーまたはポリマーに付加的な陰性に荷電した基を添加すると感知電極への補充がさらに促進される。当業者は、デンドリマーまたはポリマーに複数のシグナル伝達実体を容易に固定することができる。あるいは、金属結合タグにより認識リガンドを結合することは、アルキルチオールNTAへのそれらの結合(および結果として関連した細胞の結合)を促進する。金被覆磁気ビーズ上にフェロセンのような金属含有化合物を有するSAMsは、感知表面電

極に複合体を補充するために電磁場、または固定磁石の使用を許容する。また、リガンドを包含する感知電極は、細胞接着分子によるもののような特異的相互作用または非特異的相互作用により、直接的に、またはヒスチジンタグ標識により細胞を引き寄せることができる。

#### 【0075】

しかし、結合パートナーの一つが分析溶液より比重が大きいため、複合体が重力により沈殿する場合には、検出系への補充も単に重力を用いて行うことができる。早すぎる沈殿を避けるためにインキュベーション段階で機械的混合が行われてもよい。図32Aおよび32Bは、表面への結合相互作用を示すシグナル伝達実体および対照、を補充するための重力の使用を示す実験のACVプロットを示す。GSTは金属結合タグ/金属/キレート結合(NTA-SAM)によりコロイドに結合した。またコロイドは電子的または電気化学的シグナル伝達のためのフェロセン誘導体を提示した。陰性対照としてコロイドを測定電極に溶液中で提示し、図32Aのプロットを得た。コロイドの1セットは、グルタチオンで被覆されたポリマービーズ(アガロース)に暴露した。コロイドはグルタチオン/GST結合によりビーズに固定され、ビーズは重力により電極上に固定された。電極に近いフェロセンの電気活性検出を示す図32BのACVプロットが得られた。

10

#### 【0076】

細胞由来タンパク質生成装置として電極を使用する方法において、細胞を溶解させる電位スパイクを発生させるために電極パッド上の点を使用することができる。次に細胞の内容物をシグナル伝達リガンドとインキュベートし、相互作用を検出する。

20

#### 【0077】

さらに細胞結合分子は、伝導性分子とともにチャネルを並べ、系の検出能力を高めるために、SAMを使用してフローチャネルの底に沿って指定のトポロジーの形状にされてもよい。したがって、SAMは感知能力(光学的または電子的もしくは電気化学的)と細胞結合能力を交互にする形状で、結合部分を提示してもよい。例としては、メチル停止アルキルチオールのは SAM 中で伝導性のポリピロール基と交互になる。また、SAMのトポロジーは細胞を溝中に置き、その結果細胞の側面に沿った受容体を評価できるように操作することができる。交互官能基性 SAM の溝の形成は、共に本明細書に援用される米国特許第5,512,131号および国際特許公開公報第WO96/29629号に記載のように行うことができる。これらの複合体は電子的または電気化学的に検出することができる。1つの検出方法は、交流ボルタンメトリー(ACV)と呼ばれる電気化学的技術である。この検出方法は、より高次の調和解析のような付加的な分析技術の使用により補充することができる。これらの複合体は、SPRのような光学的手段によって検出してもよい。後者の技術を使用すると、感知表面への複合体の補充により、光学的性質の大きなシフトが引き起こされる。

30

#### 【0078】

一態様において、以下のように細胞表面タンパク質を検出し、定量することができる:細胞表面タンパク質を認識するヒスチジンタグ標識リガンドをNTA(His-タグ標識タンパク質を捕捉するため)およびフェロセン部分(電子的または電気化学的シグナル伝達のため)の両方を提示するSAMを持つコロイドに、連結させる。次に、これらの生物特異的、電子的または電気化学的シグナル伝達コロイドを、標的受容体を提示する細胞と共にインキュベートする。細胞はその後、SAM被覆電極上に沈殿させ、接着させ、または引き寄せられ、ACVにより分析される(図3)。シグナル伝達コロイドに固定化されたリガンドが細胞表面上のそれらのコグネイト受容体に結合した場合、フェロセン部分の特徴的な酸化電位で電流ピークが生じるであろう。細胞表面受容体を認識する抗体は、初めにHisタグ標識プロテインAまたはGが結合しているNTA-フェロセンを持つコロイドに結合してもよい。あるいは、抗体は金属結合タグ/金属/キレート結合によりコロイドに直接結合してもよく、ここで金属結合タグは抗体に結合さえる。ヒスチジンタグを抗体に結合するための技術は、"Construction of the single-chain Fv from 196-14 antibody toward ov

40

50

arian cancer-associated antigen CA125" Hashimoto, Y., Tanigawa, K., Nakashima, M., Sonda, K., Ueda, T., Watanabe, T., and Imoto, T.: 1999, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol 22: (10) 1068-1072.; "Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library", Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C. et al., 1996, Nature Biotechnology Vol 14 (3) p. 267.; "Expression and purification of single chain anti-HBx antibody in E. coli" Zouh G, lui KD, Sun H. C., Chen Y. H., Tang Z. Y., and Schroder C. H., 1997, vol 123 (11-12) pgs 609-13に見出すことができる。

#### 【0079】

本発明の技術の一例として、図4では、細胞へのコロイド粒子の固定を含む有用な技術の例が記載される。腫瘍マーカー、MUC-1は腫瘍細胞上に異常に発現される。ATCCから入手できるヒト組織培養乳癌細胞系統MCF-7は、MUC-1を過剰発現する。Dana-Farber Cancer Instituteから入手できる抗体50, D F3またはおおよびDF3-pは、ヒスチジンタグ標識プロテインG 56により電子的または電気化学的シグナル伝達コロイド52 (NTA-SAMs 54を持つ) に結合する。標的細胞58は、抗体を持つシグナル伝達コロイド52と共にインキュベートし、分子ワイヤ含有SAM 58で被覆した電極に電気泳動し、ACVにより分析する。電極40上のSAMは、より慣用の、堅く詰まったSAM-形成種と混合した分子ワイヤ58を含む。すべての図において説明を簡単にするために、分子ワイヤ58だけを図式的に示す。抗体を持つシグナル伝達コロイドをMUC-1を持つ細胞とインキュベートすると、電流ピークが得られる。あるいは、MUC-1の推定コグネイトリガンド、ICAMをHisタグ標識し、NTA基をもつシグナル伝達コロイドに結合してもよい。

#### 【0080】

別のアッセイを図5に示す。薬物ライブラリーは、MUC-1/ICAM相互作用のような、細胞由来タンパク質との特異的相互作用を阻害するそれらの能力に対してスクリーニングしてもよい。ICAM 64は先に記載のようにシグナル伝達コロイド62に結合し、その後MUC-1 (66)を提示する細胞70および対照細胞と共にインキュベートする。薬物候補68は、細胞およびコロイドが懸濁している溶液内に添加し、その後細胞は電極に接着し、ACVにより分析する。シグナルの損失は、薬物候補との相互作用を示す。図6は、使い捨てマイクロウェル72のアレイを微小電極74の接続可能なアレイと共に使用することにより、何千もの薬物候補を同時にスクリーニングするためにこのスキームがどのようにして容易に多重化されるかを説明する。それぞれのウェルは、図5に示されるアッセイ、または別のアッセイを含む。

#### 【0081】

次に図7では、シグナル増加アッセイのために、またはコグネイトリガンドが未知の細胞表面受容体80に結合する薬物をスクリーニングするために、小分子薬物ライブラリーを、電子的または電気化学的シグナル伝達部分34をもつコロイドまたは粒子78上で合成するか、またはそこに共有結合することができる手順が示される。シグナル伝達粒子に結合した薬物候補76は、関心のある受容体80を提示する細胞82、または対照細胞84とインキュベートすることができる。本アッセイにおける薬物-標的相互作用により、シグナルが増加する(図7)。

#### 【0082】

細胞表面受容体、 $\alpha V \beta 3$ は細胞接着分子ビトロネクチンとの相互作用により血管新生を

10

20

30

40

50



促進することが示唆されている。 $\alpha V \beta 3$ 細胞表面受容体を提示するヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)は、Cloneticsから入手できる。 $\alpha V \beta 3$ の作用を阻害する薬物のスクリーニングのために、ビトロネクチン由来のRGD-含有配列を提示するHisタグ標識ペプチドを、NTA基およびフェロセン部分を共に提示するSAMsを持つコロイドに連結させる。その後、生物特異的シグナル伝達コロイドはHUVEC細胞および薬物候補と共にインキュベートする。HUVEC細胞は電極上で増殖させることができる。しかし、細胞が溶液または懸濁液中にある場合、それらを電気泳動させるか、または感知電極に磁氣的に結合させて、ACVにより分析することができる。生物特異的コロイドは、対照細胞よりむしろ、HUVEC細胞と共にインキュベートするとき、電流ピークが生じる。薬物候補が $\alpha V \beta 3$ -RGD配列相互作用を妨害する場合、結果としてシグナル損失がおきる。既知の血管新生阻害剤エンドスタチンで $\alpha V \beta 3$ -RGD相互作用を阻害することにより、このアッセイの実行可能性が示された。アッセイは、説明したように電子的に、または標準プラスチック皿中で細胞を増殖させてアッセイを行い、細胞を40倍の倍率で観察することにより、視覚的に行うことができる。

10

#### 【0083】

あるいは、薬物候補は、ビーズ、コロイド、または電子的または電気化学的シグナル伝達部分を同様に提示する支持体上で合成されるか、それらに連結してもよい。これらの“粒子”または表面を標的細胞とインキュベートし、感知電極に引き寄せ、ACVにより分析する。吸引場を逆にし、そしてRGD配列を含むペプチドを溶液中で滴定する。細胞は再び感知電極に電気泳動され、再分析される。シグナルの損失は、薬物-細胞相互作用が $\alpha V \beta 3$ 受容体に特異的であることを示し、RGDペプチドのIC<sub>50</sub>を薬物への結合親和性と関連付けられる。

20

#### 【0084】

あるいは、同様に $\alpha V \beta 3$ に結合する49アミノ酸ペプチド、エチスタチンは、先に記載のアッセイにおいてRGD-含有ペプチドと交換するためにHisタグ標識されてもよい。

#### 【0085】

メタロセンは、以下の理由からシグナル伝達実体としてとりわけ有用である。100mVから800mV間の特有の電位でそれぞれ酸化されるように各種フェロセン誘導体を選択してもよい。それぞれの酸化電位は特有の標識を表し、その結果複数の細胞表面受容体を同時に探索することができる。細胞表面受容体とリガンドを固定化したコロイド間で生物学的に適切な相互作用が起こる場合、細胞は電子的または電気化学的シグナル伝達粒子で修飾され、その結果電流ピークが生じる。電流ピークの大きさは、シグナル伝達コロイドにより認識された細胞表面受容体の数に比例するだろう。

30

#### 【0086】

細胞表面分子は懸濁液中、または図8に示すように、組織試料中に埋め込まれた細胞上で検出することができる。凍結組織標本86は、冷凍で切片にし、RGD-含有ペプチドまたはメチル停止基のような、細胞結合基90で誘導体化されている柔軟で半透過性の膜支持体88上に直接置かれる。その後、関心のある細胞表面受容体に対するリガンド94をも提示する電子的または電気化学的シグナル伝達コロイド92と共に試料をインキュベートする。非結合コロイドは、インキュベーション時間の後に洗い流される。その後支持体膜を、細胞サイズに匹敵する電極の面積を有する、微小電極アレイ96と物理的に接触させて、ACVにより分析する。組織試料のそれぞれの部分は、タンパク質量および発現レベルを分析し、組織病理学的に関連付ける。この能力は単一細胞分析法の妥当性を保証する、なぜなら、その方法により研究者は癌細胞に特に関連したタンパク質の型を同定し、任意の異常なタンパク質発現を排除することができるからである。懸濁液中の細胞は同様に支持体膜に結合することができる。

40

#### 【0087】

この技術は、健康な組織または細胞に対して病気を罹ったそれらにおいて異なって発現される受容体またはタンパク質のような、細胞由来分子を同定するために使用することがで

50

きる。この異なる発現が、健康な組織または細胞に対して病気を罹ったそれらにおける異なる発現のレベル、および／または容易に同定することができる、組織または細胞における発現の異なる型と関連してもよい。この技術が疾患状態の測定のための診断用アッセイを容易にする。たとえば、特定の疾患であると推定される患者に関連して、細胞、具体的には、生検由来の細胞、血液試料などのような疾患の指標に関連する細胞が患者から採取されてもよく、そしてこれらの細胞は、疾患を示す発現レベルまたは型を測定するために健康な細胞に対して分析することができる。また、各種病理学的状態に関与する細胞由来タンパク質のアップレギュレーションを阻害する薬物をスクリーニングするためにこの系を使用することができる。薬物スクリーニングのための2つの技術の例として以下のものが挙げられる：(1) 疾患と推定されるか、またはその徴候を示す患者に候補薬物を投与し、そして疾患の治療における薬物の効力を測定するために先に記載の患者の細胞を含む生物学的試料をモニターすること；(2) 疾患を有すると推定されるまたは有する患者由来の細胞を含む生物学的試料を採取し、生物学的試料または細胞の成分を候補薬物に暴露し、そして先に記載の技術を使用して、発現レベルおよび／または型をモニターすること。一度結合パートナー（薬物、抗体、または細胞由来タンパク質のタンパク質／ペプチドリガンドを含んでいてもよい）が同定されると、結合パートナーは疾患状態または治療に反応した細胞由来タンパク質の発現レベルを定量するために検出部分に結合させることができる。これは細胞表面および細胞内コンパートメントの両方への細胞由来タンパク質の発現および移動に対する薬物候補の間接的影響を試験する、いずれのアッセイであってもよい。

10

20

#### 【0088】

また本発明は、個々の細胞表面上および／または組織試料中に埋め込まれた細胞上の細胞表面受容体発現の型を視覚的に研究するための能力を提供する。これは、疾患状態に関連付けることができる細胞表面受容体発現の型を示すことができる。また、これらは診断または薬物スクリーニング方法に使用することができる。具体的なアッセイにおいて、細胞表面受容体に結合するリガンドを持つコロイド粒子は個々の細胞または埋め込まれた細胞に暴露され、そして個々の細胞に関するそれらの結合の位置は、視覚的に測定可能で、細胞表面受容体発現の型を示す。たとえば、MUC-1は乳癌に関連する細胞表面受容体である。正常にはMUC-1は、各種細胞型の表面に均一に発現される。各種癌に関連する形質転換細胞において、受容体は過剰発現され、細胞の先端部分に濃縮される。これは、記載された技術を使用して測定することができる。薬物スクリーニングにおいて、形質転換細胞の培養物が提供され、薬物候補により処理されてもよい。先端での型発現の損失が検討される。この態様において、視覚的同定はヒト裸眼、顕微鏡、吸光光度法、電子顕微鏡検査法、蛍光検出などによる観察のような本明細書に記載の任意の技術を含んでいてもよい。

30

#### 【0089】

先に記載の電子的または電気化学的検出を含む技術では、発現された種のレベルは、個々の細胞または他の非常に少量のものを含む試料をそれぞれ含む試料間で比較することが可能であり、そして型は組織試料を含むより大きな試料上で測定することができる。先に記載の視覚的検出態様では、発現された種のレベルは、大きな試料および単細胞試料を含む小さい試料の両方に発現された種の型と同様に測定することができる。電子的または電気化学的検出に有用なシグナル伝達実体は、フェロセンのような酸化還元活性分子を含む、電子的または電気化学的検出のために本明細書に記載されたシグナル伝達実体を含む。先に記載の視覚的検出では、コロイドを含む本明細書に記載のいずれかのシグナル伝達実体は単独で、または蛍光もしくは視覚的に同定可能な実体のような補助的なシグナル伝達実体を有しているものとして、使用することができる。複数のシグナル伝達実体を使用されてもよい（すなわち、結合事象ごとに複数のシグナル伝達）。電子的もしくは電気化学的または視覚的シグナル伝達ではともに、異なるアッセイに関して異なるシグナル伝達実体を使用してもよい。たとえば、第1の受容体またはタンパク質を標的にするように選択された第1のリガンドは、第1のシグナル伝達実体に関して固定化されてもよく、一方第2

40

50

の受容体またはタンパク質を標的にするように選択された第2のリガンドは、第2のシグナル伝達実体に関して固定化されてもよい。電子的または電気化学的シグナル伝達では、異なるシグナル伝達実体が異なる酸化還元電位を含んでいてもよく、それらの間の差は電子的に区別可能であり、そして視覚的同定では、異なるシグナル伝達実体が異なる色の放射性または吸収性実体であってもよい。そのような場合、タンパク質または受容体の発現レベルおよび型が測定されるだけでなく、型は一つの受容体またはタンパク質の発現の位置と他のそれを区別することができる。

#### 【0090】

また、先に記載の生物特異的コロイドは *in vivo* 画像診断を容易にするために使用することができる。使用されるコロイドは金であり、それは比較的不活性である。腫瘍マーカーに対する抗体または他のリガンドを提示するように誘導体化されている金コロイドは、内部に取り込ませるか、または注入することができる。コグネイト腫瘍マーカーを提示する腫瘍塊はコロイドで覆われ、濃縮装置として作用するであろう。次に腫瘍はX線、およびX線コンピュータトモグラフィ（CT）のような画像診断技術により検出することができる、なぜなら、有効な結果は金属中に包まれた腫瘍塊であってもよいからである。溶液中の個々のコロイドは検出に対して見えないであろう。また、生物特異的コロイドでそのように標識されている腫瘍は、MRI（磁気共鳴イメージング）により検出することができる。画像診断技術は、常磁性金属および他の対比物質、たとえばFe、Gd、またはCrを取り込むことにより高めることができる。対比物質は、コロイド上に形成されたSAMsに金属キレートチオールを取り入れることによりコロイドに結合させることができる。あるいは、腫瘍上に発現される標的タンパク質のコグネイトリガンドだけを提示するSAMsは、対比物質材料からなる粒子上で形成されてもよい。鉄または磁鉄鉱コアを有するコロイドは、金で被覆され、生物特異的SAMsで誘導体化されてもよい。あるいは、リポソーム様粒子がキレート基で停止された脂質鎖から形成され、その結果金属対比物質が“コア”を形成し、生物特異的リガンドが溶媒に暴露されてもよい。あるいは、コロイドが生物特異的リガンドに加え、特異的分光分析的特徴を有する部分を持っていてもよく、その部分はRaman分光法を含むエネルギー吸収、または散乱技術により検出することができる。画像診断装置は本体の外側に含まれるか、または観察機械の本体もしくは光ファイバーに導入されてもよい。あるいは、腫瘍塊上で濃縮された場合、高周波を伝える部分を持つコロイドが検出可能なシグナルを生成してもよい。個々のコロイド由来のシグナルは、腫瘍塊に結合したコロイドの集合物から生成されるシグナルに比べ、無視できるか、または検出不可能でなければならない。

#### 【0091】

図9では、2つのタンパク質がお互いに相互作用するかどうかを測定するために、第1のタンパク質104をNTA 54およびフェロセンリガンド34を共に提示するコロイド106に結合し、第2のタンパク質100をNTAリガンド54のみを提示するSAM-磁気ビーズ102に結合させるであろう。2つの粒子型は一緒に混合され、その後磁石108が下にある感知電極40に磁氣的に補充される。磁気ビーズが2つのタンパク質種の相互作用によりシグナル伝達コロイドに結合した場合だけ、電子的または電気化学的シグナルが生成されるであろう。また、非ヒスチジンタグ標識タンパク質も、シグナル伝達または磁気（補充可能）粒子の上に、それらは荷電され、そしてカップリング化学に関与しない暴露基で停止したチオール（たとえばNTAチオール）とともにカルボキシで停止するチオールをを組み込んだSAMsを形成することにより、それらに連結できる。次に、第1級アミンを提示するいずれかの分子を結合させるために標準EDC/NHSカップリング化学を使用することができる。電子的または電気化学的標識工程はタンパク質製造工程と分かれているため、一般的な電子的または電気化学的シグナル伝達コロイドおよび磁気粒子を使用して系を効率的に多重化してもよい。これは、研究者が癌の分子的特徴を明確にするのに役立つタンパク質相互作用データベースの構築を容易にする。

#### 【0092】

相互作用するタンパク質パートナーは、小分子薬物ライブラリーとともにインキュベート

10

20

30

40

50

することができ、および薬物リードはシグナルの損失を検出することにより識別した。あるいは、小分子薬物ライブラリーは既知の標的タンパク質に結合する薬物候補を直接スクリーニングするための磁気ビーズ上のものを購入してもよい。

#### 【0093】

また、本明細書に記載の基礎的な技術は、酵素活性を調節する薬物をスクリーニングするために使用することができる。ある酵素は、進行性疾患に重要なものであると同定されている。ある場合には、分子は活性になるためにその特異的部位で開裂されなければならない、これを行う酵素の活性を阻害する薬物のスクリーニングが望まれるであろう。本明細書に記載の技術を、この目的のために以下で記載のように使用することができる：

以下に記載したものはこの技術の実行に有用である：Edelstein and Distefanoは、光励起性交差結合部分で修飾されたファルネシルピロフォスフェート基が、酵母FPTによりRAS由来のペプチドモチーフに添加できることを報告している (Edelstein R. and Distefano M. (1997). Photoaffinity labeling of yeast farnesyl protein transferase and enzymatic synthesis of a RAS protein incorporating a photoactive isoprenoid. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 235, 377-382)。彼らの目的は、このアッセイを使用して、2つを交差結合することにより、ファルネシル誘導体がFPTにより認識されることを示すことであった。この発見は、酵素活性または特異性を妨害せずにピロフォスフェートから離れた末端で、ファルネシルまたはゲラニル部分をビオチンで修飾することができるという概念と一致する。

#### 【0094】

図10では、既知の結合パートナー (BP1) がある分子122に、酵素開裂部位 (ECS) 110が1つの末端112で連結することができる。他の末端114では、それがSAM (HS-R-X) に取り込まれてもよい分子116に連結していてもよく、ここでSは硫黄であり、RはSAMに取り込まれることができる分子種であり、そしてXはリンカーである。得られた分子は、電子的シグナルを送達できる基118 (HS-R-XM) (または電極近くに引き寄せられたとき、電子的または電気化学的シグナルを変換することができる他の基) と共にコロイド116上でSAMsに組み込まれてもよく、ここでMは酸化還元・活性金属もしくは遷移金属である。磁気ビーズまたは粒子120は、相互標的分子 (BP3) に同時に結合することにより直接的、または間接的のいずれかにより、BP1 122に結合する分子124 (たとえばストレプトアビジン) (BP2) を提示するように誘導体化されてもよい。

#### 【0095】

たとえば、電子的または電気化学的シグナル伝達コロイド116は、酵素開裂部位 (ECS) を持ち、およびビオチンで停止したチオールにより誘導体化されてもよい。磁気ビーズはストレプトアビジンにより誘導体化されてもよい。磁気ビーズおよびシグナル伝達コロイドは関心のある酵素および薬物候補と共にインキュベートしてもよい。薬物候補が酵素作用を調節するか、または阻害する場合、(たとえば、タンパク質またはペプチドの) 部位は開裂されず、そしてシグナル伝達コロイドはビオチン/ストレプトアビジン相互作用により磁気ビーズに連結するであろう。複合体が磁氣的に感知電極に連結するとき、結果として電流ピークが発生し、アッセイはシグナルの増加検出アッセイになる。すなわち、タンパク質は1つの末端でのSAM-形成種、およびビーズ120上に固定化された結合パートナー24に結合可能な結合パートナー122を介してコロイド116およびビーズ120の両方に結合するように適合してもよく、そして開裂またはその調節がモニターされてもよい。タンパク質は記載されたものを含む各種の方法でコロイドおよびビーズに結合してもよい。または、さらにコロイドが金属を配位結合するキレートを提供してもよく、タンパク質が金属結合タグにより提供されていてもよい。本発明はさらにいっそう一般化され、そこにおいてコロイド粒子116およびいずれかの非コロイド構造、たとえ

ばビーズ120の両方への結合に適合したいずれかの実体が、実体を開裂する能力を有する酵素、および酵素活性を低下させる候補薬物の両方の存在下で、コロイドおよび非コロイド構造に提示され、そしてそこに結合してもよい。非コロイド構造は図解したようにビーズであってもよく、または電極自体であってもよい。

#### 【0096】

BP1はBP2および/またはBP3と同じであってもよい。たとえば、ECSおよびBP1（ビオチン）を持つチオールは、遊離ストレプトアビジン（BP3）、次に磁気ビーズ上のビオチン（BP2）に結合してもよい。あるいは、標的分子に分子の基を添加する酵素を阻害または促進しようとしてもよい、すなわちコロイド粒子および非コロイド構造を、非コロイド構造への結合に適合した酵素の基質、粒子への結合に適合した酵素活性により基質に結合可能な分子種、および基質に対する酵素に暴露してもよい。このことはさらに、酵素の活性調節のための候補薬物の存在下で行ってもよく、非コロイド構造は固定化された電気活性実体を持つコロイド粒子を持つ磁気ビーズであってもよい。あるいは、非コロイド構造は電極表面であってもよい。

10

#### 【0097】

具体的には、図11では、そのような場合、電子的または電気化学的シグナル伝達コロイド126は、キレート/金属/金属結合タグ結合によって、基が添加される分子128により誘導体化される。添加される小片、添加分子130は第1の結合パートナー（BP1）132（ビオチンであってもよい）により停止する。磁気ビーズ12は、BP1の結合パートナー（BP2）134（ストレプトアビジンであってもよい）を提示する。コロイド、磁気ビーズ、添加分子、関心のある酵素および薬物候補をインキュベートし、その後分析のために電極に引き寄せる。対照に比較したシグナルの損失は、薬物候補が酵素活性を阻害することを示し、一方シグナルの増加は薬物により亢進した酵素の活性を示す。

20

#### 【0098】

本発明に従って、電極、コロイド粒子などのようなアーティクルの表面で結合パートナー、シグナル伝達実体などのような所望する種を提示するために、各種のSAMsをさまざまな種類の表面上で使用する事ができる。当業者は、さまざまな種類の表面、官能基、スペーサー部分などの中から選択することができる。例示的な説明は、米国特許第5,620,850号に見出すことができる。また、この米国特許はニトリロトリ酢酸、2,2'-ビス（サリシリデンアミノ）-6,6'-デメチルジフェニル、および1,8-ビス（ $\alpha$ -ピリジル）-3,6-ジチアオクタンなどを含む、使用することができる各種金属結合タグについて説明する。

30

#### 【0099】

ビーズを含む各種非コロイド構造は先に記載される。ビーズはポリマー材料、アガロース、テンタゲル、および/または磁気材料を含むことができる。ポリスチレンビーズは非常に有用である。本発明のこれらおよび他の態様の効用および利点は、以下の実施例により十分に理解されるであろう。以下の実施例は本発明の利点を説明することを意図するが、本発明の完全な範囲を例証しない。

#### 【0100】

以下の実施例および実験は、本発明の具体的な態様を説明し、本発明がいずれか特定の態様に限定されると解釈すべきではない。

40

以下に記載の態様のいくつかにおいて、実施例はSAM形成、コラーゲン被覆、細胞増殖、コロイド形成、および交流ボルタンメトリー（ACV）を含む。SAM形成のために、顕微鏡用ガラススライドはTiの層、次にAuの層で覆った。それぞれの電極はRTで0.5時間、10%メチル停止チオール（HS-（CH<sub>2</sub>）<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>）、40%トリーエチレングリコール停止チオール、HS（CH<sub>2</sub>）<sub>11</sub>（CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>）<sub>3</sub>OH、（式）および50%MF-1を含有する、300 $\mu$ lのDMF溶液でインキュベートした。その後、チップを含むシンチレーションバイアルに400 $\mu$ M トリーエチレングリコール停止チオール2mlを添加し、バイアルは以下の様に水浴中で熱サイクルにかけた：2分間@55℃；2分間@37℃；1分間@55℃；2分間@37℃続いてRTで10分間。その

50

後電極はEtOHに浸し、続いて滅菌PBSで洗浄した。それらは、生物学的安全性キャビネット中でLTV殺菌灯下に1時間置き、滅菌を確実にした。

#### 【0101】

コラーゲン被覆のために、PBS中の0.005mg/ml コラーゲンの200μL液滴をそれぞれの電極に添加し、4℃で2時間インキュベートした。

細胞増殖のために、電極を細胞増殖フラスコに入れ、培養培地および特定の細胞表面受容体αVβ3を提示するヒト内皮細胞(HUECs)の溶液を添加した。電極および細胞含有溶液はCO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間、37℃でインキュベートした。100倍の倍率による肉眼検査は、細胞が電極に接着し、増殖の表現型であるウェブ様の広がりを示したことを示した。

10

#### 【0102】

コロイド製造のために、市販の金コロイド(Auro Dye) 1.5mlをで微量遠心管中で高速で10分間遠心分離し、ペレットにした。ペレットは保存用バッファー(クエン酸ナトリウムおよびTween-20) 100μLに再懸濁した。90μM ニトリロトリ酢酸(NTA)-チオール、90μM フェロセン-チオール、および500μMカルボキシ停止チオールを含有するジメチルホルムアミド(DMF)溶液100μL。そのチオール溶液中で3時間インキュベーション後、コロイドをペレットにし、上清を捨てた。それらをDMF中の400μM トリーエチレングリコール停止チオール100μL中で、2分間、55℃；2分間、37℃；1分間、55℃；2分間、37℃、続いて室温で10分間インキュベートした。コロイドはその後ペレットにし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS) 100μLを添加した。コロイドは次にコロイド保存用緩衝液中の180μM NiSO<sub>4</sub>で1:1に希釈した。PBS中の100μMのHis-タグ標識ペプチド 100μLを、コロイドを提示するNTA-Ni(II) 100μLに添加し、0.5時間インキュベートした。遊離の非結合ペプチドを取り除くために、その後コロイドをペレットにし、上清を捨てた。コロイドペレットは100μL PBSに再懸濁した。コロイドは以下のいずれかに結合した：a) αVβ3受容体に結合するように設計されたペプチド、HHHHHHH(S<sub>4</sub>G<sub>1</sub>)<sub>3</sub>GRGDSGRGDS；またはb) 不適切なペプチド、HHHHHHH-グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)。RGDMモチーフを含むペプチドは内皮細胞上のαVβ3受容体に結合することが示されている。ビトロネクチン(αVβ3の天然のリガンド)中のRGDMモチーフが相互作用に関与すると考えられている。

20

30

#### 【0103】

ACV分析は、CH Instruments electrochemical analyzerを使用して行われた。3電極系が使用された。銀対塩化銀参照電極を白金補助電極とともに使用した。誘導体化された金被覆チップを作用電極として使用した。25mVの過電位が10Hzの周波数で電極に適用された。

#### 【0104】

##### 【実施例】

##### 実施例1

この実施例はファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ(FRT)およびゲラニルゲラニルタンパク質トランスフェラーゼ(GGPT)の阻害剤のスクリーニングのためのアッセイを記載する。

40

#### 【0105】

本発明者らは以下のことを容易に多重化できるアッセイを考案している：1) 初期スクリーニング工程に野生型標的タンパク質および変異体を組み入れる；2) 関心のある酵素によるファルネシル/ゲラニル基およびそれらの類似体の標的タンパク質への添加を直接検出し、定量する；および3) 酵素活性に対する薬物候補の異なる作用を検出できる。本発明者らの研究方法は以下のとおりである：1) NTA/Ni(II)基(ヒスチジンタグ標識タンパク質を捕捉するため)および電子的または電気化学的シグナル伝達のためにフェロセンのような遷移金属の両方を提示するSAMSを持つコロイドにヒスチジンタグ標

50

識 R A S タンパク質（または各種変異体由来のペプチドモチーフもしくはフラグメント）を結合させる；2）ビオチンでファルネシルピロフوسفエート誘導体を修飾する（図13）；3）酵素を添加する；4）候補阻害剤を添加する；5）ストレプトアビジンをもつ磁気ビーズを添加する；6）感知電極に磁氣的に引き寄せ、電子的に分析する。酵素 F P T は、シグナル伝達コロイド上に固定化された R A S にビオチン化ファルネシル（またはゲラニル）部分を添加するだろう。ストレプトアビジンをもつ磁気ビーズはビオチンに結合し、その複合体は補充も検出も可能であろう。アッセイは、微小電極アレイと接続したマイクロウェル中で、シグナル伝達コロイド上に固定化された R A S 変異体および薬物候補を変えて、並行して行われるであろう（図14および15）。微小電極アレイの全体は、特定の標的タンパク質のための酵素活性に対する薬物候補の異なる作用を測定するために電子的に分析されるであろう。薬物候補が標的変異体タンパク質にファルネシル基を添加する酵素を妨害する場合、結果として電子的または電気化学的シグナルが減少するであろう。

10

#### 【0106】

この研究方法は酵素の活性をモニターするか、またはその活性を調節する薬物のスクリーニングに使用することができる。また、非ヒスチジントグ標識タンパク質は標準カップリング化学によりシグナル伝達コロイドに結合することができる。あるいは、ファルネシル誘導体は、磁気ビーズ上に固定化された基の結合パートナーである、ビオチン以外の認識基により修飾されてもよい。

20

#### 【0107】

Edelstein および Distefano は、光励起性交差結合部分で修飾されたファルネシルピロフوسفエート基が、酵母 F P T により R A S 由来のペプチドモチーフに添加できることを報告している (Edelstein R. and Distefano M. (1997). Photoaffinity labeling of yeast farnesyl protein transferase and enzymatic synthesis of a RAS protein incorporating a photoactive isoprenoid. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 235, 377-382)。彼らの目的は、ファルネシル誘導体が F P T と交差結合することにより、F P T により認識されることを示すためにこのアッセイを使用することであった。この発見は、酵素活性または特異性を妨害することなしに、ピロフوسفエートから離れた末端でファルネシルまたはゲラニル部分がビオチンで修飾できるという概念と一致する。

30

#### 【0108】

##### 実施例 2

この実施例では、細胞を S A M s により誘導体化された金被覆電極に連結させた。電極に連結したままの細胞は次に、金コロイドを含む溶液と共にインキュベートし、それらのコロイドは、細胞表面上の受容体に特異的なリガンドおよび電子的または電気化学的シグナルを電極に送達することができる酸化還元 - 活性金属を共に提示するように誘導体化されていた。多少のインキュベーション時間の後、電極は交流ボルタンメトリー (A C V) により読みとった。コロイド結合リガンドおよび細胞表面受容体間の正の相互作用が、同様にコロイド上にある酸化還元 - 活性金属を電極の十分近くに引き寄せ、電子的または電気化学的シグナルを変換するであろう。

40

#### 【0109】

より具体的には、電極への電子の流れを容易にするために、電極は 50% ビス (エチルフェニルチオール) (すなわち、 $C_{16}H_{10}S$ ) のバックグラウンド中で 10% メチル頭基を提示するように S A M s により誘導体化された。40% トリエチレングリコール停止チオール ( $HS(CH_2)_{11}(CH_2CH_2)_3OH$ ) が単分子層の充填を促進するために包含された。細胞増殖がコラーゲンで被覆された H S C 15 - メチル停止 S A M s 上で維持できることは以前に示されていた。H S C H<sub>2</sub> C<sub>15</sub> C H<sub>3</sub> およびコラーゲンは共に絶縁分子であり、電極への電子の流れを妨害することができる。このため、本実施例で

50

は、飽和炭素鎖 - コラーゲン被覆度を低下させ、より伝導性の分子ワイヤに隣接した増殖細胞の島状構造を生じた。細胞表面受容体  $\alpha V \beta 3$  を提示する、血管新生に重要なヒト内皮細胞 (H U V E C s) は電極上で増殖した。受容体のリガンドおよび電子的または電気化学的シグナル伝達のためのフェロセン部分を持つ S A M - 被覆金コロイドは細胞提示電極としばらくインキュベートし、その後 A C V により分析した。

#### 【0110】

A C V 分析のために、1 m l 容量のシリコンガasketを細胞提示電極上に固定した。H i s タグ標識 R G D モチーフペプチドを前もって結合させた N T A - N i コロイド 1 0 0  $\mu$  l および 1 0 0  $\mu$  l P B S を細胞提示電極と共にインキュベーションするためにガasketに添加した。1 5 分後、初めの A C V スキャンが記録された。1 5 分間隔で2つの連続したスキャンが記録された。電流出力は電圧に対してプロットされた。初めのスキャンは P B S バッファーに特徴的な広幅の電流バルジを生じた。第2および第3のスキャンは、特徴的なフェロセン電位 (7 8 0 m V o l t s) においてそれぞれ 0 . 5  $\mu$  A m p s および 1 . 6  $\mu$  A m p s の異なる電流ピークを発生した、図 1 6 を参照されたい。H i s タグ標識 G S T が予め結合した N T A - N i ( I I ) コロイド 1 0 0  $\mu$  l と共に同じ細胞を提示する同一の電極をインキュベートした陰性対照は、R G D - 提示コロイドと共にインキュベートした電極に類似した第1のスキャンを生じた。しかし広幅のバルジは、第2および第3のスキャンで減衰し、同一であった (図 1 7)。陽性対照の 1 . 6  $\mu$  A m p s のピークと明らかに異なり、陰性対照では鮮明なピークは見られなかった。

#### 【0111】

#### 実施例3：伝導性表面上の細胞増殖

この実施例では、コラーゲンで被覆されていない“伝導性”表面上での細胞増殖の電子的検出について記載する。細胞は、いくつかの場合には単分子層に構築されるが、コラーゲンでは被覆されなかった硫黄含有分子で修飾された金電極上で増殖させた。1 0 0 % 候補薬物と共にインキュベートした電極がトリ - エチレングリコール停止チオール中で循環加熱されないことを除いて、電極修飾は実施例2の電極製造部分に記載したように行われた。いくつかの電極を同じ細胞増殖フラスコ中に集め、H U V E C 細胞を含む培地を添加した。電極および細胞は C O <sub>2</sub> インキュベータ中で24時間インキュベートした。表面は1 0 0 倍の倍率を使用して視覚的に分析した。表1は、表面修飾およびその後の細胞接着／増殖の特徴を記載する。表面は低い非特異的結合を示した。しかし、ひとたび細胞が結合すると、細胞増殖は十分であった。S A M を介して金属を配位結合する金属キレートを提示したタンパク質上の金属結合タグによって S A M にタンパク質を結合し、タンパク質が細胞を引き寄せることにより、細胞を S A M 上に容易に固定化することができる。結果を実証するために写真を撮影した (示していない)。細胞は、フェロセン部分および細胞表面の  $\alpha V \beta 3$  受容体に特異的な、ペプチド、H H H H H H H ( S <sub>4</sub> G <sub>1</sub> ) <sub>3</sub> G R G D S G R G D S ; または陰性対照としての、不適切なペプチド、H H H H H H H - グルタチオン S - トランスフェラーゼ ( G S T ) を提示するコロイド (先に記載) と共にインキュベートした。図 1 8 は、1 0 0 % エチニルフェニルチオール ( M F 1 ) S A M - 被覆電極上で増殖した細胞を、 $\alpha V \beta 3$  受容体に特異的なリガンドを持つコロイドと共にインキュベートしたとき (図 1 8、実線) だけ電流ピークを生じ、不適切なペプチド G S T により誘導体化されたコロイドと共にインキュベートしたとき (図 1 8、点線) は生じなかったということを示す。

#### 【0112】

図 1 9 は、絶縁トリ - エチレングリコール停止チオールのバックグラウンド中で25 % 2 - メルカプトエチルエーテルにより誘導体化された電極の電気化学的スキャンを示す。R G D 配列ペプチドを提示するコロイドで誘導体化された細胞は小ピークを生じ (図 1 9、実線)、一方 G S T ペプチドを提示するコロイドと共にインキュベートした細胞はピークを生じなかった (図 1 9、点線)。

#### 【0113】

#### 【表1】

10

20

30

40

50



表面修飾	細胞接着 1/2時間以内	細胞増殖 24時間以内
100% メチル停止SAM	NO	NO
100% メチル停止SAM、不適切な蛋白質 とインキュベート	NO	NO
100% メチル停止SAM、コラーゲンとイ ンキュベート	NO	YES
分子ワイヤチオールバックグラウンド中の 10% メチル停止チオール、トリ-エチレン グリコール停止チオールを持つか、または持た ず、その後コラーゲンで被覆	NO	YES
100% トリ-エチレングリコール停止SA M	NO	YES
100% HS-2単位分子ワイヤ	NO	YES
100% 2-メルカプトベンゾチアゾール	NO	YES
100% 1, 2-ベンゼンジメタンチオール	NO	YES
100% ベンゼンエタンチオール	NO	YES
100% 2-メルカプトエチルエーテル	NO	YES
フェロセンチオールが混合されているか、また は混合されていないトリ-エチレングリコール 停止チオールバックグラウンド中のNTA-N i (II)-Hisタグ標識ペプチドが結合し ていない	NO	YES
フェロセンチオールが混合されているか、また は混合されていないトリ-エチレングリコール 停止チオールバックグラウンド中のNTA-N i (II)-不適切なHisタグ標識ペプチド が結合している	NO	NO
フェロセンチオールが混合されているか、また は混合されていないトリ-エチレングリコール 停止チオールバックグラウンド中のNTA-N i (II)-細胞特異的Hisタグ標識ペプチ ドが結合している	YES	YES

## 【0114】

実施例4：グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/グルタチオン結合を介したコロイド  
粒子によるポリマービーズの修飾

図20および21を参照されたい。以下の実施例は、標的タンパク質の結合パートナーで  
ある小分子、薬物候補、ペプチド、タンパク質、核酸、またはそれらの組合せを提示する  
非コロイド粒子上に、標的タンパク質を提示するコロイドがどのように凝集するかを説明  
する。多くのコンビナトリアル薬物ライブラリーは非コロイド粒子またはビーズ上で合成  
され、医学的に適切な標的種を表示するコロイド粒子と混合することができる。標的種の  
結合パートナーである薬物を表示するビーズは容易に同定することができる、なぜなら、  
コロイド粒子がそのビーズ上に凝集し、それを赤く着色するからである。

## 【0115】

標的タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) はヒスチジンタグ標  
識され、そしてNTA-Ni (ヒスチジンタグ標識はNTA-Niに結合する) を提示す  
るSAM-被覆コロイド上に固定化された。表面上に40 μM NTA-Niを提示する  
コロイド30 μlを21.5 μM GST 65 μlに添加し、溶液中のGST最終濃  
度を14 μMとした。GSTを結合する小分子グルタチオンは、アガロースビーズに結合  
したものをSigma-Aldrichから入手できる。グルタチオン被覆ビーズは、G  
ST-結合コロイドの溶液とともにインキュベートした。数分以内に、GSTはグルタチ

10

20

30

40

50

オンビーズに結合し、着色コロイドを溶液から除去し、ビーズを赤く修飾した（図20）。GSTに結合しない、小分子を表示するビーズは、GST結合コロイドとインキュベートしたとき、無色のままであった（図21）。第2の陰性対照（その中でグルタチオン被覆ビーズをGST非存在下でNTA-Niコロイド  $30\mu\text{l}$  とインキュベートした）は、NTA-Niコロイドがビーズ表面に、またはグルタチオンに非特異的に結合しないことを示した。

#### 【0116】

##### 実施例5：SAMの電子透過性の制御の実例

この実施例は、促進された電子的連絡を含むSAMを形成する能力を示す。SAMは、第1の堅く詰まる種および、電子的連絡に対するSAMの透過性を高める、異なる分子構造の第2の種の混合物を含んで表面上で形成される。表面が暴露された流体が表面と電氣的に連絡できるように、欠陥、または開口部がSAM中に形成される。具体的には、全体としてSAMに関して破壊的な構造を有する硫黄含有小分子が安定してSAMに取り込まれ、電子に対する透過性亢進が示された。この実施例は、表面を電氣的に比較的伝導性にし、およびその後、細胞増殖を支持できることを示す。

#### 【0117】

水溶性フェロセン誘導体は電解質溶液： $500\mu\text{M}$   $\text{NaClO}_4$  中のフェロセンジカルボン酸の $100\text{mM}$ 溶液、に溶解した。作用電極は、異なる量の2-単位分子ワイヤ（MF1）を含むSAMにより誘導体化された金被覆電極であった。特徴的なフェロセン電位でのピークの高さを分子ワイヤ密度の関数としてプロットした。陰性対照として、金被覆電極は $100\%$  トリ-エチレングリコール停止チオールからなる絶縁SAMで誘導体化した。図22は、SAMの“伝導性”、または溶液中の電子がSAMに侵入する能力が、SAMに統合された2-単位分子ワイヤの密度の関数であることを示す。この系は、一連の硫黄含有化合物で修飾された電極の伝導性を試験するために使用された。 $50\%$  候補薬物および $50\%$  トリ-エチレングリコール停止チオールにおいて、化合物をDMF中に溶解した。電極は実施例1に記載のように誘導体化した。表2は、ACVにより分析したときの、候補薬物および生じた電流ピークの高さを表にする。図22は、ポリ（エチニルフェニルチオール）による単分子層破壊の関数としての、単分子層の伝導性試験の2つの実験結果を示す。

#### 【0118】

SAMsは、DMF中の $500\mu\text{M}$  トリエチレングリコール停止チオールおよび $500\mu\text{M}$  のメルカプトベンゾチアゾールまたは2-メルカプトエチルエーテルのいずれかから、金チップ上で形成された。チップは平らな表面と $1\text{ml}$  容量のシリコンガasket間に固定された。フェロセンジカルボン酸溶液は、 $500\mu\text{M}$  の $\text{NaClO}_4$  中に溶解し、 $\text{Ag}/\text{AgCl}$  参照電極およびPt補助電極とともにシリコンガasket中に入れた。金チップは作用電極に結合した。系はACVにより分析した。溶液中のフェロセンが電極と電氣的に連絡することにより得られた電流ピークの大きさは、電極と連絡するSAM内に欠陥を作製することにより、SAMの電子流への透過性を高める試験化合物の能力の指標であった。図23は、単に絶縁種トリ-エチレングリコール停止（CH2） $11-\text{SH}$ （+++線）および、報告によれば伝導性が亢進した、ポリ-エチニルフェニルチオール種（MF1）（実線）を単独で包含するSAMのオーバーレイである。伝導性ポリ-エチニルフェニルチオール種はより伝導性であると予想される、なぜなら、同一の分子で2つの付加的な反復単位を持つものは伝導性であると報告されているからである（Science 1997 Bumm et al., ）。予測したように、アルキルチオールSAMは、フェロセンジカルボン酸溶液中で電流ピークを生じないが、 $50\%$  ポリ-エチニルフェニルチオールからなるSAMはそれを生じる。図24は、2-メルカプトエチルエーテル（実線）およびメルカプトベンゾチアゾール（+++線）を含む伝導性が亢進したSAMsに対する図23のプロット（点はTEG停止チオール、星印はポリ-エチニルフェニルチオールである）を示し、ポリ-エチニルフェニルSAM由来の電流ピークは、 $50\%$  2-メルカプトエチルエーテルを包含するSAMs、または $50\%$  メルカプトベン

ゾチアゾールを包含するSAMにより発生するピークより桁違いに小さいことを示し、SAMに伝導性種を取り込むことによるか、またはSAMに“欠陥”または“開口”分子を挿入することにより、SAMsが電子流に透過性になるという概念に一致する。

#### 【0119】

表2. 電極は、トリ-エチレングリコール停止チオールバックグラウンド中で以下の化合物により誘導体化された。電極製造は、実施例1に記載のように行われた。表面の“伝導性”または透過性は、電解質溶液(0.5M NaClO<sub>4</sub>)中のフェロセンジカルボン酸の酸化/還元により生じた電流ピークの大きさを測定することによりアッセイした。非特異的結合に抵抗するそれぞれの化合物の能力は、測定前にBSA(ウシ血清アルブミン)にそれぞれの表面を浸すことによりアッセイした。非特異的に吸着されたタンパク質は、単分子層から電極への電子の伝導を妨げるであろう。

#### 【0120】

【表2】

化合物	50%被覆度 におけるピークの高さ : Amps	25%被覆度 におけるピークの高さ : Amps	BSAでプロ ッキング後の 25%被覆度 におけるピークの高さ : Amps	100%被覆 度またはその 画分における 細胞増殖の支持
HS(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> トリ- エチレングリコール 100%被覆度-陰性対 照	0	ND	ND	YES
HS-2-単位 分子ワイヤ 陽性対照	0.415	ND	50%被覆度 において0. 15	YES
2-メルカプトピリジン	14.70	ND	ND	ND
2-メルカプトベンゾチ アゾール	44.00	0.28	0.29	YES
ジチオスレイトール	41.00	ND	ND	ND
1,2-ベンゼンジチオ ール	40.00	ND	ND	ND
1,2-ベンゼンジメタ ンチオール	34.90	28.00	4.02	YES
ベンゼンジエタンチオ ール	31.50	0.51	0.08	YES
2-メルカプトエチルエ ーテル	39.30	57.70	19.0	YES

#### 【0121】

##### 実施例6: タンパク質-タンパク質相互作用の検出

この実施例は、固定化されたシグナル伝達実体および固定化されたタンパク質を有するコロイド粒子の有用性を示す(図27参照)。

#### 【0122】

ヒスチジンタグ標識グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-His)は、40 μM NTA-Niおよび100 μMフェロセンチオールを表示する、NTA-SAM-被覆コロイドに連結させた。プロテインAを提示する市販の磁気ビーズは、抗-GST抗体により1/10の結合容量に被覆し、1:5の比でGST-コロイドに添加し、そして磁石の頂部に置いた50% MF-1 SAM被覆電極上で測定した。磁石は電極表面に磁気ビーズを引き寄せ、厚い、可視の沈殿物を形成した。GST-コロイドは磁気ビーズ上のGST抗体と相互作用し、電極表面に引き寄せられ、約280 mVにおいて電流ピー

クを生じた。2つの陰性対照、G S Tがコロイド表面に結合しない対照、およびG S T抗体が磁気ビーズに結合しない他の一つの対照を使用した。いずれの陰性対照も電流ピークを生じなかった。図25はこの実例の結果をプロットする。実線は、G S T - H i s - 提示コロイドおよび磁気ビーズ上の抗 - G S T / A b間の相互作用を表す。○はG S Tを提示しないコロイドとインキュベートした抗体を提示する磁気ビーズを表す。●はG S Tを提示するコロイドとインキュベートした抗体を提示しないビーズを表す。

#### 【0123】

##### 実施例7：細胞検出

この実施例は、S A Mを横切る電氣的連絡を高める分子種を含む混合物を含み、S A Mに欠陥を形成することにより、表面が暴露された流体が表面と電氣的に連絡できる表面上のS A Mを形成する利点、および固定化されたシグナル伝達実体を持つコロイドのタンパク質への連結の有用性を共に説明する。タンパク質は次にはS A Mを提示する電極の表面に連結した細胞に固定化される。この場合の欠陥は、フェニル環を含むS A Mに組み込まれた分子のバルクにより生じる。

#### 【0124】

H U V E C細胞は培地に懸濁し、金表面上を被覆したS A Mとフラスコに入れた。S A Mは、50% 直鎖チオール、および50% 2-単位ポリ(エチニルフェニル)チオール(M F 1)を含んでいた。8.4 mM R G D - H i s ペプチド溶液 5  $\mu$  lを培地に添加し、細胞を一晩37度でインキュベートして電極表面に接着させた。約16時間後、R G D - H i s ペプチドを捕捉するためのN T Aおよびシグナル伝達のためのフェロセンを提示するS A M - 被覆コロイド 100  $\mu$  lを細胞に添加し、室温で20分間インキュベートした。次に電極をバッファで洗浄し、どのような非結合コロイドも洗い流して、測定した。電流ピークは200~250 mVで記録した。陰性対照は、細胞に結合できない不適切なタンパク質、H i s - G S Tと共にインキュベートした細胞であった。コロイドを陰性対照に添加し、電極をバッファで洗浄し、測定を行った。陰性対照ではピークは全く見られなかった。図26は、フェロセンシグナル伝達実体および細胞表面受容体に対するh i s タグ標識リガンドを提示するコロイドが、細胞/表面相互作用により電極表面に運ばれたときに、発生したピーク(実線)を示す。菱形は陰性対照を表し、コロイドは細胞表面受容体に結合しないように選択された不適切なタンパク質を提示した。

#### 【0125】

##### 実施例8：非修飾リガンドに対するリガンド-受容体相互作用の検出

この実施例は、タンパク質またはリガンドのいずれも標識せずに、S P Rの非存在下で、タンパク質/リガンド相互作用を測定するための能力を示す。具体的には、電極表面上にリガンドおよびフェロセンを含むS A Mを形成することにより、リガンドと相互作用すると推定されるタンパク質にリガンドを暴露すること、ここでリガンドは、その電気活性シグナルがタンパク質への接近度に依存する電気活性実体、すなわちフェロセンと一定の接近関係にある。

#### 【0126】

本発明者らは、フェロセン誘導体の特徴的な酸化電位はフェロセン誘導体の局所環境の化学的性質に基づいてシフトされてもよいことを見出している。タンパク質はフェロセン誘導体の近くに運ばれるため、変化した電位において第2の電流ピークが現れる。この変化したピークの大きさは系のタンパク質の密度に比例する。

#### 【0127】

一連の金-被覆電極は、トリ-エチレングリコール停止チオールバックグラウンド中で一定密度の伝導性分子ワイヤチオールおよび可変密度のメチル停止チオールを含む、異種のS A Mにより誘導体化された。以下のことは以前に示されている：1) トリ-エチレングリコール停止S A M sはタンパク質の非特異的吸着に抵抗する；および2) メチル停止S A M sはタンパク質、特にコラーゲンに結合する。したがって、電極を溶液中のコラーゲンと共にインキュベートする場合、非特異的に吸着するコラーゲンの密度はメチル停止チオールの密度が増大するにつれて増大するであろうと考えた。2%、4%、10%および

10

20

30

40

50

15%メチル停止チオールを含むSAMsが金被覆電極上に形成された。電極の半分はPBS中の0.005mg/ml コラーゲンと共に4℃で2時間インキュベートし、他の半分はPBSのみとインキュベートした。電極は、電解質溶液(0.5M NaClO<sub>4</sub>)に溶解した水溶性フェロセン誘導体、フェロセンジカルボン酸と共に交流ボルタンメトリー(ACV)により分析した。特徴的な電位におけるフェロセンの交互の酸化/還元が電流ピークを生み出す。この電流ピークの大きさおよびそれが発生する電位が記録された。低密度メチル停止チオールでは、電流ピークは約450mVで発生した；その大きさおよび位置はタンパク質、コラーゲンの存在により影響されないと考えられた。10%以上の高密度のメチル停止チオールでは、タンパク質コラーゲンの存在下でのみ、第2の電流ピークが約300mVで生じる。図28は、フェロセンジカルボン酸の存在下における高密度メチル停止チオール電極を示す。実線は、メチルチオールに結合したコラーゲンを持つ電極を表す。電極表面上のコラーゲンにより生み出された疎水性の環境は、フェロセンの酸化電位をシフトさせ、2つのピークが見られる。黒丸はコラーゲンに結合していない高密度メチル停止チオール電極を表し、したがってフェロセンの酸化に影響を与えない。

10

#### 【0128】

この研究方法は、非修飾タンパク質、ペプチド、細胞の存在を検出するために以下のように使用することができる：混合SAMはアルキルチオールに連結したフェロセンジカルボン酸SAMを電子流について透過性にするチオールおよび標的種の結合パートナー（結合パートナーは、ヒスチジンタグ標識され、SAM中のNTA-Ni部分への結合により電極に結合していてもよい）で停止するチオールから形成される。標的種が試料溶液中に存在する場合、それはSAM上に提示されているその結合パートナーに結合する。SAM表面の近くタンパク質の存在は、フェロセンジカルボン酸のまわりの化学的環境を変化させ、その酸化電位をより低い電位側にシフトさせる。固定化された酸化還元-活性金属の特徴的な酸化電位のシフトが標的種の存在を示す。

20

#### 【0129】

これらの実験が環上に極性置換基を持たないフェロセン誘導体により行われると、作用は全く観察されなかった。したがって、この研究方法が機能するには、固定化された酸化還元-活性金属が極性環境中にあり、固定化された結合パートナー（チオールによりSAMに結合された）ができるだけ小さいことが極めて重要である。

#### 【0130】

30

#### 実施例9：ELISA

分子または細胞生物学の技術者によく知られた技術は酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)(Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, Immunology 11.2, 1996, 著作権所有者Wiley and Sons Inc. 1994-1998)である。ELISAに伴う重要な問題は感度である。酵素シグナル伝達は1:1の比で起こる；1抗体に結合した酵素は、1抗原の存在をシグナル伝達する。したがって、抗原のマイクログラム量が効果的なELISAに必要なものであるが、すべての場合に妥当ではない。このことから、低レベルで発現されるか、または提示される細胞表面上の抗原の検出にはELISAは適さない。ELISAに伴う別の問題は、低い抗原濃度では、アッセイに非常に時間がかかることである。酵素加水分解の量は、加水分解の時間に直接比例する。一般にELISAを行う場合、標的種はプラスチック支持層に直接的にか、または間接的に連結させる。次に固定化された種の存在は、同様にシグナル伝達能力を有する“第2”の抗体がそれに結合することにより検出される；第2の抗体は、典型的にはホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)といった酵素、または添加された基質上で結果として色に変化する反応(分光光度計により検出される)を行うことができる蛍光タグ、もしくは蛍光計により検出できる蛍光標識タグに通常は結合されている(たとえば、“Localization of a passively transferred human recombinant monoclonal antibody to herpes simplex virus glycoprotein D to i

40

50

n f e c t e d n e r v e f i b e r s a n d s e n s o r y n e u r o n s  
i n v i v o", S a n n a P P, D e e r i n c k T J, a n d E l l i s  
m a n M H, 1999, J o u r n a l o f V i r o l o g y O c t. V o l  
7 3 ( 1 0 8 8 1 7 - 2 3 ) を参照されたい)。多くの場合、便宜上すべての抗体が酵素  
に結合する必要があるように、マウス抗体を特異的認識抗体として使用し、その後酵素結  
合ウサギ - 抗マウス抗体を添加する。

#### 【0131】

本明細書に記載の技術を使用して、E L I S A の感度を非常に高め、そしてプローブ分子  
として天然のリガンド（タンパク質もしくはペプチド）または薬物候補を使用して固定化  
された標的種の存在を検出することができる。固定化された種の存在は、複数のホースラ  
ディッシュペルオキシダーゼ（H R P O）またはアルカリホスファターゼ（A P）をも提  
示するコロイドに結合したリガンドをそれに結合することにより検出する。酵素は、酵素  
に直接連結したヒスチジンタグを含む各種の手段により、またはヒスチジンタグ標識プロ  
テインGを介してコロイドに結合するヤギ抗体に、マウス - 抗ヤギ酵素結合抗体を結合す  
ることにより、コロイドに好都合に結合することができる（A k e r s t o m, B., N  
i e l s o n, E., B j o r c k, L. J o u r n a l o f B i o l o g i c a l  
C h e m i s t r y, 1987 O c t. 5 V o l. 262 (28); p g s. 13  
388-91 and F a h n e s t o c k, S. R., A l e x a n d e r, P.,  
N a g l e, J. and F i l p u l a, D. (1986) J o u r n a l o f B  
a c t e r i o l o g y V o l. 167, 870-880)。複数の酵素と共にコロイ  
ドに共固定化されたりガンドを第2抗体の代わりに標的種に結合することにより、結合事  
象に対するシグナル伝達分子の比は桁が増加する。E L I S A プレート上に提示された抗  
原へのコロイド上の1抗体またはリガンドの結合の結果、間接的に何千または何百万の酵  
素が結合する。あるいは、既知の種を意図的に96 - ウェル上プレートのウェルに結合さ  
せ、それぞれがシグナル伝達酵素と共に異なる薬物候補を提示することをコロイドにより  
調べることができる。今のところ、現在のE L I S A 技術ではこれを行うことは不可能で  
ある。なぜなら、それぞれの薬物候補は酵素に結合することができないからである。ある  
いは、固定化された標的に対する天然のリガンドが、シグナル伝達酵素と共にコロイド上  
に提示されてもよく、および薬物候補が相互作用を破壊するためにプレートのそれぞれの  
ウェルに添加されてもよい。非結合コロイド、およびしたがってそれらのシグナルは洗浄  
工程で失われる。抗体 - またはリガンド提示コロイドの標的は、E L I S A プレートに直  
接的または間接的に（別の抗体またはリガンドにより）結合した細胞またはタンパク質で  
あってもよい。E L I S A のこの修正の利点は感度だけでなく、効率にもある。数百のシ  
グナル伝達酵素がコロイドにより1抗原に結合したままであるため、基質加水分解がより  
速く起き、より少ない時間で適切な解釈が行われるであろう。

#### 【0132】

実施例10：細胞表面受容体とコロイド固定化リガンドの相互作用およびその阻害の視覚  
的検出

この実施例は、以下のこと除いては実施例3に記載の方法で行われた。細胞は複数ウェル  
プレート上で増殖させた。相互作用後、肉眼検査は、受容体が発現される細胞上の位置で  
の、コロイドによる細胞の選択的な修飾を示した。図29Aでは、全く結合が起きない対  
照が示される。任意の配列のペプチドが使用された。図29Bは、タンパク質が発現され  
る細胞上の位置におけるコロイドによる選択的な細胞の修飾を示す。

#### 【0133】

実施例11：非特異的に固体支持体に結合した一結合パートナーとコロイドに結合した他  
のパートナーとの間の結合相互作用の検出

タンパク質、具体的にはストレプトアビジン（P r o m e g a）は、非特異的に固体支持  
体、具体的にはQ - セファロースに連結した。その結合パートナー、ビオチンは、コロイ  
ド粒子上の自己組織化単分子層に組み込まれたチオールに共有結合的に連結した。コロイ  
ド粒子をビーズに暴露すると、ビオチンとストレプトアビジン間の結合により固定化され

、ビーズを赤く着色した。図30Aは、結合相互作用により修飾されたビーズ（本来、赤色）のコンピュータデジタル化顕微鏡画像の写真複写である。図30B（対照）は、修飾されなかったビーズの同様の画像である；同様のビーズ（ストレプトアビジン - 結合）は不適切なタンパク質を提示するコロイドに暴露された。

#### 【0134】

また、この実施例は、重要なことには、コロイド粒子上にビオチンを含む自己組織化単分子層について記載する。ビオチンSAMsは、以下のようにコロイド上に形成された。DMF中に580  $\mu$ M COOH停止チオールおよび20  $\mu$ Mビオチン停止チオールを含む溶液が作製された。チオールはC11であった。コロイド製造は先に記載のように行い、記載された20  $\mu$ Mビオチンおよび580  $\mu$ M COOHチオールのDMF溶液はコロイドとともにインキュベートした。他の工程は先に記載したものと同様であった。

#### 【0135】

##### 実施例12：単一結合事象の複数のシグナル伝達によるELISA

この実施例は以下の例外／詳細を伴って、典型的なELISAと同様に行われた：洗剤および界面活性剤は洗浄工程から除かれた。GSTを、マルチウェルプレート上に固定化した。マウス抗-GST抗体をウェルに添加し、GSTに結合させた。一般的な洗浄工程後、ウェルの第1セット（実験用）にヒスチジンタグ標識プロテインGを提示するコロイドを添加し、抗-GSTに結合させた。ウェルの第2のセット（対照）にはプロテインG固定化コロイドを暴露しなかった。別の一般的な洗浄工程後、すべてのウェルにホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-マウス抗体を暴露した。次にすべてにホースラディッシュペルオキシダーゼ基質および硫酸を暴露した。反応は、通常の方法で進行させた。プレートはマルチウェル分光光度計リーダーにより分析した。

#### 【0136】

この実施例の結果は、ホースラディッシュペルオキシダーゼがコロイド粒子上の複数のG位置に結合するに従い、実験用ウェルが対照ウェルに比べ6桁大きいシグナル伝達を示すことを示す。図31は、この6桁の増大を示す棒グラフである。この実施例は、複数のシグナル伝達実体による、第1の生物学的または化学的作用物質の単一の結合の、第2の生物学的または化学的作用物質へのシグナル伝達を示す。複数の実体のシグナル伝達は、それらがコロイド粒子に結合すると同時に起こる。

#### 【0137】

##### 実施例13：コロイド表面上に提示された自己組織化単分子層への非修飾化学的または生物学的分子の連結、具体的には、コロイドへのストレプトアビジンの連結

この実施例は、カルボン酸またはその塩を提示することができる表面へのいずれかの本質的にアミンを含有する実体の連結のための技術を提供する。技術は、コロイド表面上に形成された自己組織化単分子層への連結により、コロイドに実体を連結するために使用することができる。自己組織化単分子層に連結される分子は、結合前に親和性タグなどのような、いずれかの特定の化学的官能基を含む必要がない。ただ一つの要件は、多くのアミノ酸に見出されるように、少なくとも一つの第1級アミンを含むということである。したがって技術は、表面にカルボン酸を提示するコロイドに第1級アミノ基を持つタンパク質またはペプチドを共有結合するためにとりわけ適する。

#### 【0138】

コロイド上に自己組織化単分子層を形成するための技術は先に記載されている。これらの技術には、以下の具体的な詳細な説明および但し書きが付け加えられた。

#### 【0139】

タンパク質はコロイド表面上のカルボキシレート（SAMによって結合）とペプチドのアミン残基間にアミド結合を形成することにより結合した。アミド結合は、修正されたEDC/NHSカップリングプロトコルの適用により形成された。カップリングの成否は、ストレプトアビジンを提示するコロイドとビオチン基を提示するコロイド（ビオチンSAMを介して、先述）を混合することにより試験した。ストレプトアビジンが首尾よく結合した場合、2つの型のコロイドは凝集し、懸濁液が色を変え、最後にコロイドが沈殿して透

10

20

30

40

50

明な溶液が残るであろう。

【0140】

カップリング手順に使用されるコロイドは、他に記載されたように製造し、 $540\mu\text{M}$ （マイクロモラー） $\text{COOH}$ 停止チオール、 $60\mu\text{M}$   $\text{NTA}$ -停止チオールを含有するチオール溶液中でのインキュベーション、およびその後の $400\mu\text{M}$  エチレングリコール停止チオール中での循環加熱により形成された。 $\text{PBS}$ 中の $50\mu\text{l}$ コロイドは、水中の $50\mu\text{l}$ の $10\text{mM}$   $\text{EDC}$ 、 $40\text{mM}$   $\text{NH}_4\text{S}$ で処理された。7分後、コロイドを遠心分離して沈殿させ、液体を除去し、その後 $\text{pH}6.4$ のリン酸バッファー中の $0.1\text{mg/ml}$  ストレプトアビジン  $500\mu\text{l}$ （マイクロリットル）に再懸濁した。1.5時間後、コロイドの未反応部位をエタノールアミンを添加することによりブロックし、そしてコロイドを遠心分離して沈殿させ、その後 $\text{pH}6.4$ のリン酸バッファー  $100\mu\text{L}$ 中に再懸濁し、過剰な、結合しなかったストレプトアビジンを洗い流した。コロイドはその後再び遠心分離して沈殿させ、 $50\mu\text{l}$   $\text{PBS}$ に再懸濁した。 $20\mu\text{L}$  リン酸バッファーおよび $15\mu\text{l}$  ビオチン提示コロイドの混合物に、先に製造されたストレプトアビジン-提示コロイド  $15\mu\text{l}$ を添加した。この懸濁液を $35\mu\text{l}$  リン酸バッファーおよび $15\mu\text{l}$  ビオチン提示コロイドの混合物と比較した。ストレプトアビジン-提示コロイドの添加は、赤色から青色への速やかな色の変化を引き起こした。～10分後、ビオチンコロイドおよびストレプトアビジンコロイドの混合物は透明になり、底に沈殿物が見られた。ビオチンコロイドを含まない混合物は視覚的な変化がなく、赤色のままであった。

10

20

【0141】

先に記載のプロトコルは、コロイド上の自己組織化単分子層への、アミンを含む本質的にどんな化学的または生物学的分子の結合にも適用できる。結果として凝集を起こす複数のコロイドへの結合よりむしろ、ただ一つのコロイドへの1分子の結合を確実にするために、以下の修正を適宜行ってもよい。望ましく結合した分子の濃度を維持し、そして $\text{EDC}/\text{NH}_4\text{S}$ 反応物質の濃度を維持する一方で、溶液中のコロイドの濃度を低下させてもよい。各種分子に対して当業者は、他のわずかな修正を行ってもよい。アミン-含有分子は、当業者により選択されてもよく、そして限定はしないが、タンパク質、合成分子、ペプチド、誘導体化核酸、および他のアミンを含む誘導体化された、または天然に存在する生物学的分子を含んでいてもよい。当業者は、本発明のこの態様に従ってコロイドに連結可能にするために、多様な種がアミンまたはアミン-含有種とともに合成されるか、またはそれらに連結してもよいことは理解するだろう。

30

【0142】

当業者は、本明細書に記載のすべてのパラメータは例示的なものであって、実際のパラメータは本発明が使用される方法および装置についての具体的な用途に依存することを容易に理解するであろう。したがって、先の態様は実施例のためだけに提示されること、および添付の請求項およびそれらと同等のものの範囲内で、具体的な記載とは異なって本発明が実行されてもよいということを理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は無傷細胞上のリガンドのコグネイト細胞表面受容体と相互作用する dendrimer またはポリマーを介して、フェロセンのような金属含有化合物に連結したリガンドを表す。

40

【図2】

図2は無傷細胞上のリガンドのコグネイトの受容体と相互作用する粒子に結合したリガンド、フェロセンのような金属含有化合物を表す。

【図3】

図3は、コロイド上の自己組織化単分子層に練得  $k$  つしたタンパク質を示し、それらは電子的または電気化学的シグナル伝達のための酸化還元-活性金属も提示する。標的受容体を持つ細胞は、関心のある受容体に対するコグネイトリガンドを持つコロイドとインキュベートし、続いて感知電極に電気泳動的に、または磁氣的に引き寄せられる。図は一定の

50



比率に拡大したものではなく、そしてコロイドは20の金原子から直径数百ナノメートルまでに及ぶ、各種サイズで作られてもよい。

【図4】

図4は、腫瘍マーカーMUC-1特異的抗体、DF-3を持つ電子的シグナル伝達コロイドとインキュベートされるMUC-1を有する細胞を表す。抗体は、コロイド上の自己組織化単分子層に取り込まれたNTA/Ni(II)基に結合するHisタグ標識プロテインGを介して、コロイドに結合する。

【図5】

図5は、薬物ライブラリーの個々のメンバーの細胞表面受容体との相互作用を阻害する能力をスクリーニングするために使用することができる、アッセイの一態様を示す。

10

【図6】

図6は、マイクロウェル（使い捨てであってもよい）と微小電極アレイおよびロボットをつなぎ合わせるにより、薬物スクリーニングアッセイを容易に多重化できることを示す。電極アレイの分析は、多数の電極の同時分析が可能な、修正した電気化学的アナライザーを使用して行うことができる。電極はマイクロウェルに挿入されるように（矢印を参照されたい）設計することができる。

【図7】

図7は、電気活性シグナル伝達部分をも持つ粒子上で合成されるか、またはそれらに共有結合的に連結することができる薬物候補を示す。シグナル伝達粒子に連結した薬物候補は、関心のある受容体を提示する細胞、および関心のある受容体を発現しない対照細胞と共にインキュベートすることができる。このアッセイにおける薬物-標的相互作用の結果、シグナルが増加するであろう。

20

【図8】

図8は、RGDモチーフを含むペプチドとの相互作用により、柔軟な、半透過性支持体に連結する組織試料を示す。次に、試料は関心のある細胞表面受容体に対するリガンドを持つ、電気活性シグナル伝達コロイドとインキュベートする。試料を洗浄し、次に微小電極アレイにつなげる。電極アレイは電極の面積が細胞の面積に相当するように作製することができる。試料はさらにACVにより特徴付け、その後組織病理学に関連付けることができる。

30

【図9】

図9は一般的な補充およびシグナル伝達粒子に基づいた、容易に多重化可能なタンパク質-タンパク質相互作用アッセイを示す。Hisタグ標識タンパク質を選択的に捕捉するNTA/Ni(II)リガンドを持つ自己組織化単分子層は、シグナル伝達コロイドおよび金被覆磁気ビーズ上に形成される。次に、それぞれの粒子型を、異なるHisタグ標識タンパク質と手短にインキュベートする。次に磁場が磁気ビーズを感知電極に引き寄せる。第1タンパク質と第2タンパク質間の相互作用を通してコロイド上の電気活性標識（酸化還元活性部分であってもよい）が電極に運ばれるときだけ、シグナルが変換される。非Hisタグ標識タンパク質もカルボキシ停止チオールを提示する、自己組織化単分子層を持つ一般的な粒子に結合できることに注意されたい。

40

【図10】

図10は、酵素開裂部位(ECS)を持ち、ビオチンで停止したチオールにより誘導体化された電気活性シグナル伝達コロイドを示す。磁気ビーズはストレプトアビジンにより誘導体化し、次に磁気ビーズとシグナル伝達コロイドを関心のある酵素および薬物候補と共にインキュベートする。もし薬物候補が関心のある酵素の作用を阻害すると、その部位は開裂されず、そしてシグナル伝達コロイドはビオチンストレプトアビジン相互作用により磁気ビーズに結合したままである。得られた複合体が磁気的に感知電極に結合するとき、電流のピークが得られ、アッセイがシグナル増加検出アッセイになるであろう。

【図11】

図11は、酵素活性を調節する薬物のスクリーニングのための研究方法を示す。このスキームにおいて、酵素修飾の標的であるタンパク質は、やはり電気活性部分を持つコロイド

50

に連結する。酵素が標的タンパク質に添加する化学基はビオチンで標識されている。酵素機能が適切であるとき、ビオチン標識化合物はシグナル伝達コロイド上のタンパク質に添加される。このようにして得られた複合体は、さらにストレプトアビジン被覆磁気ビーズに結合する。複合体はさらに感知電極に電磁氣的に引き寄せられる。薬物候補はアッセイに添加されてもよい。対照に比較したシグナルの損失は、薬物候補が酵素の活性を阻害したことを示し、一方シグナルの増加は薬物が酵素の活性を高めたことを示すであろう。

【図 1 2】

図 1 2 は、ファルネシル基、ファルネシルピロフォスフェート、およびゲラニル-ゲラニルピロフォスフェートの化学構造を示す。

【図 1 3】

図 1 3 は、ビオチンのような認識基によるファルネシル-またはゲラニル-様部分の修飾を示す。

【図 1 4】

ビオチン部分を持つファルネシルピロフォスフェート誘導体を示す。ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ (FPT) 酵素は、RAS タンパク質変異体へのファルネシル誘導体の添加を触媒する。複合体を感知電極に補充するためにストレプトアビジンを持つ磁気ビーズを使用するとき、酵素の活性、または薬物候補が酵素活性を修飾する能力は電流出力を測定することにより定量することができる。

【図 1 5】

図 1 5 は、薬物候補がそれらの酵素活性を調節できる能力に対して評価されてもよいことを示す。空間的にアドレスできるマイクロウェルは RAS タンパク質 (野生型または変異体)、FPT 酵素、ビオチン修飾付加基 (ファルネシル誘導体)、ストレプトアビジンを持つ磁気ビーズ、およびプラスまたはマイナス薬物候補を含む。電極は、さらに交流ボルタンメトリー (ACV) を含む、各種電子的および電気化学的技術により分析することができる。

【図 1 6】

図 1 6 は、RGD-含有リガンドとコラーゲン被覆電極上で増殖する細胞との相互作用の ACV 分析のプロットを示す。

【図 1 7】

図 1 7 は、(陰性) 対照リガンドとコラーゲン被覆電極上で増殖する細胞との相互作用の ACV 分析のプロットを示す。

【図 1 8】

図 1 8 は、伝導性分子の単一の型のみを含有する金属支持体上で増殖する細胞の ACV 分析のプロットを示す。

【図 1 9】

図 1 9 は、RGD-含有リガンドと、絶縁および伝導性分子の不均一単分子層を含む金属支持体上で増殖する細胞との相互作用の ACV 分析のプロットを示す。

【図 2 0】

図 2 0 は、コロイドで修飾されたビーズ、具体的にはタンパク質/タンパク質相互作用によりビーズに結合したコロイドの写真の写真複写である。

【図 2 1】

図 2 1 は、図 2 0 で示された実験の陰性対照の写真の写真複写である。

【図 2 2】

図 2 2 は、(絶縁種の芝生中の) 伝導性分子の割合の増大に従った単分子層の伝導性増大を表すプロットを示す。

【図 2 3】

図 2 3 は、フェロセン溶液とともに測定した、非伝導性自己組織化単分子層の陰性対照に対する 2 単位分子ワイヤ、ポリ (エチニルフェニル) チオール、MF 1 を含有する伝導性自己組織化単分子層の単分子層の伝導性の ACV 分析のプロットを示す。

【図 2 4】

10

20

30

40

50

図 2 4 は、フェロセン溶液とともに測定した、より高い伝導性単分子層に対して測定した、図 2 3 の 2 つの自己組織化単分子層の単分子層の伝導性の A C V 分析のプロットを示す。

【図 2 5】

磁気ビーズへのコロイドの結合により測定した、タンパク質／タンパク質相互作用の A C V 分析を示す。

【図 2 6】

図 2 6 は、対照に対する自己組織化単分子層を横切る増大した電子的連絡、および細胞表面へのタンパク質固定化の酸化還元シグナル伝達の A C V 表示を示す。

【図 2 7】

図 2 7 は、図によるアッセイの説明であり、磁気ビーズへのコロイドの結合により測定したタンパク質／タンパク質相互作用のプロットは、図 2 5 に示す。

10

【図 2 8】

図 2 8 は、表面 - 結合タンパク質を含む電極、およびフェロセン酸化電位に対するそれらの作用（実線）および陰性対照（点線）の A C V 分析のプロットを示す。

【図 2 9】

図 2 9 A および 2 9 B は、受容体が発現される部位で選択的にコロイドにより修飾される細胞（2 9 B）および対照（2 9 A）の顕微鏡写真（倍率 4 0 倍）の写真複写である。

【図 3 0】

図 3 0 A および 3 0 B は、自己組織化単分子層上で、タンパク質の結合パートナーを持つコロイド粒子により修飾された非特異的に結合するタンパク質を持つビーズ（3 0 A）および対照（3 0 B）のコンピュータデジタル化顕微鏡画像の写真複写である。

20

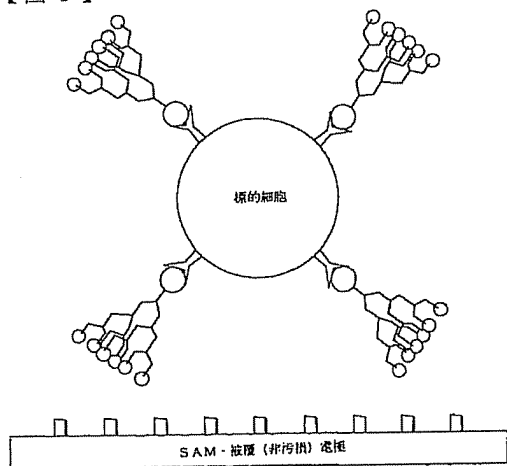
【図 3 1】

図 3 1 は、複数のシグナル伝達実体により単一結合事象をシグナル伝達することに起因する、6 桁改善されたシグナル伝達を示す棒グラフである。

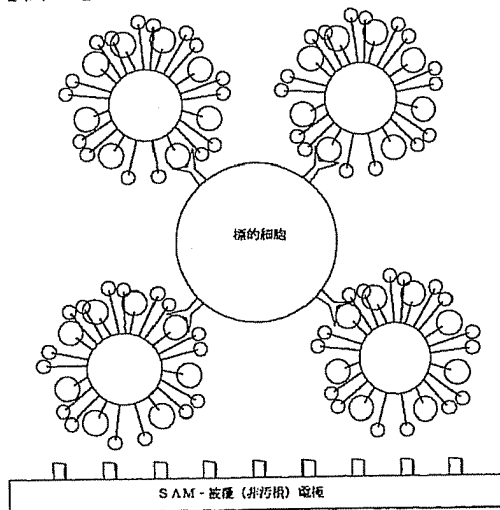
【図 3 2】

図 3 2 A および 3 2 B は、表面への結合相互作用を示すシグナル伝達実体を補充するための重力の使用を表示する実験、および対照の A C V プロットを示す。

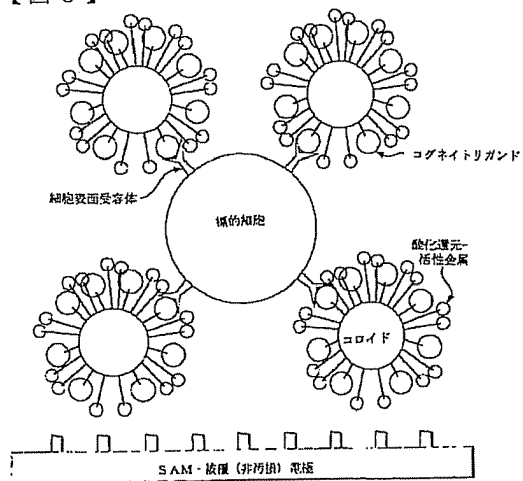
【図 1】



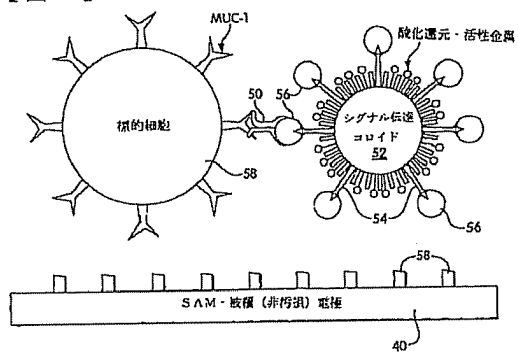
【図 2】



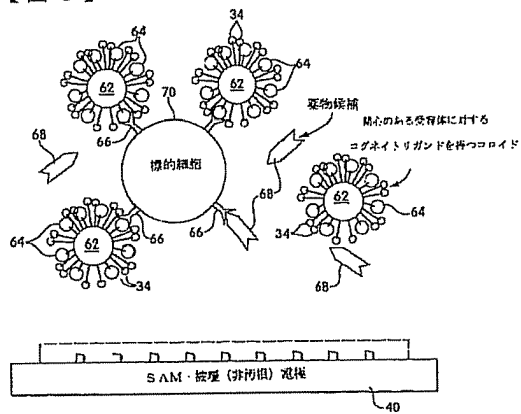
【図 3】



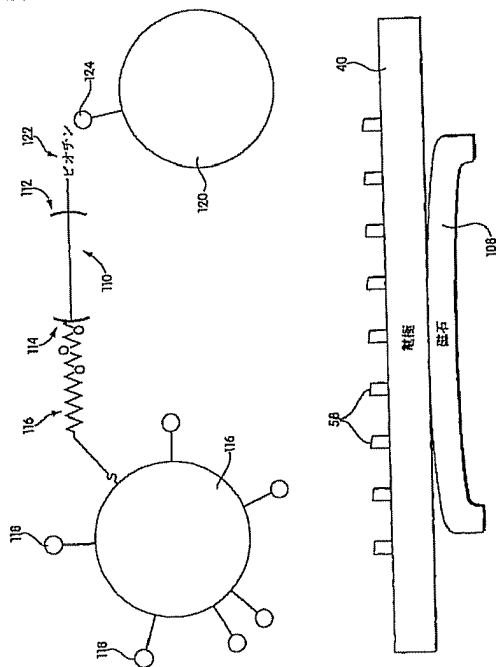
【図 4】



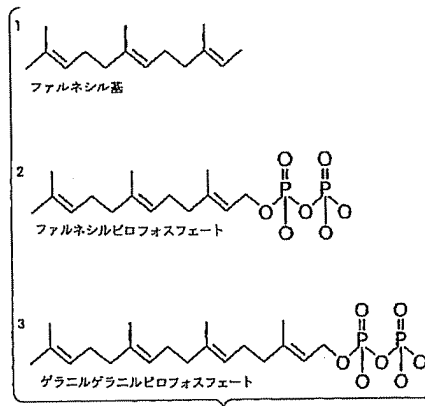
【図 5】



【圖 10】



【图 12】



【図 13】

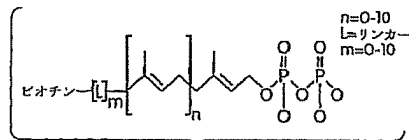


Fig. 13A

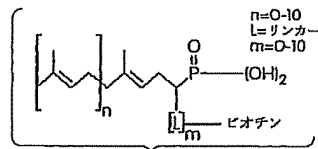


Fig. 13B

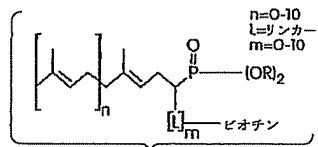


Fig. 13C

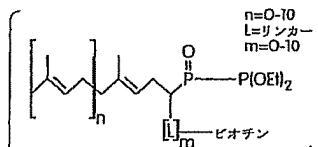
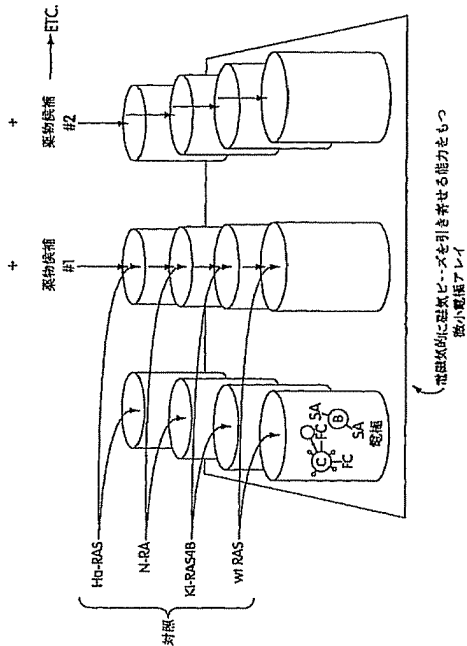
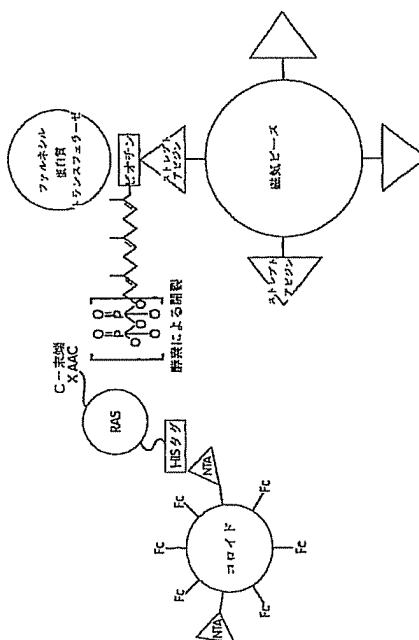


Fig. 13D

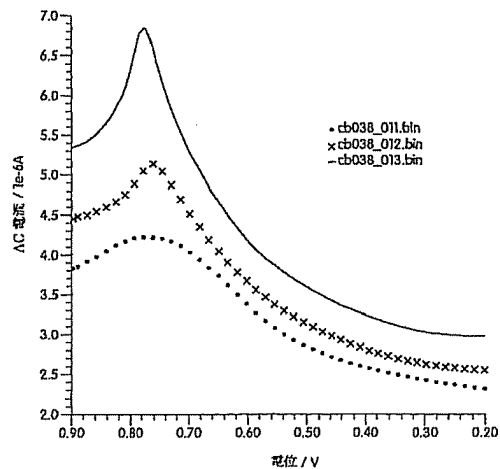
【図 15】



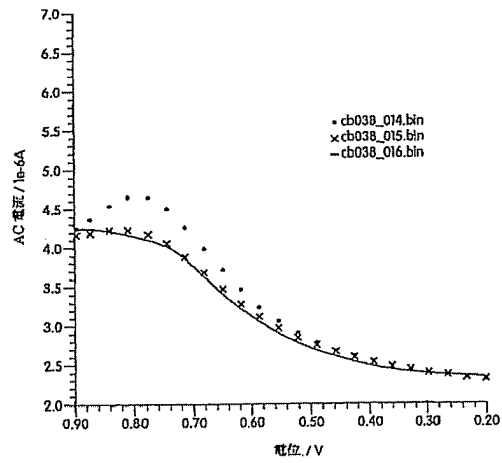
【図 14】



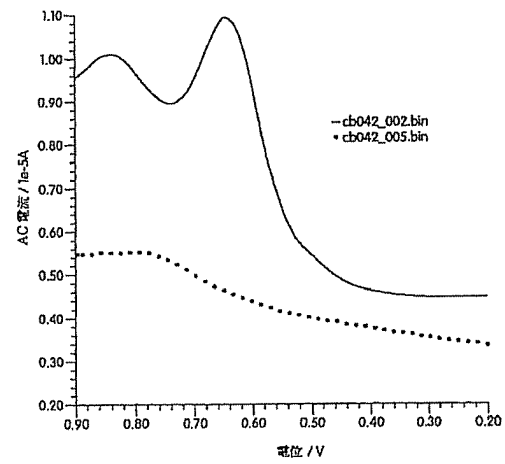
【図 16】



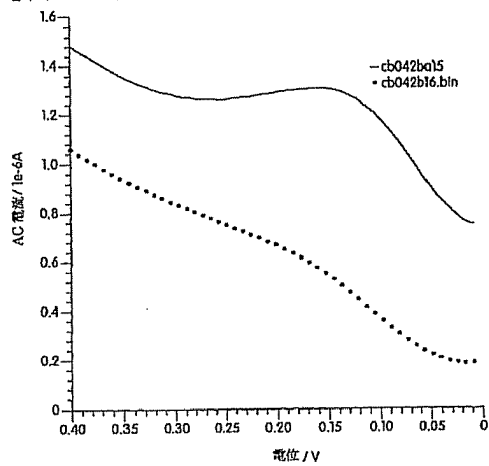
【図 17】



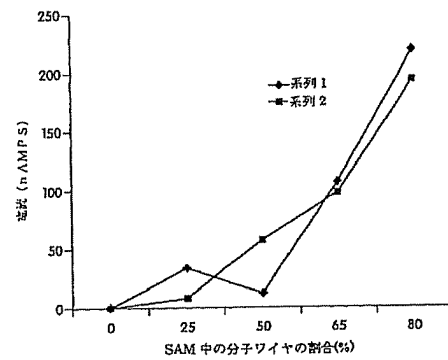
【図 18】



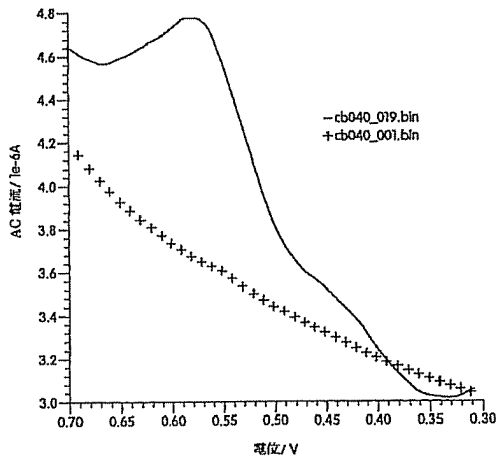
【図 19】



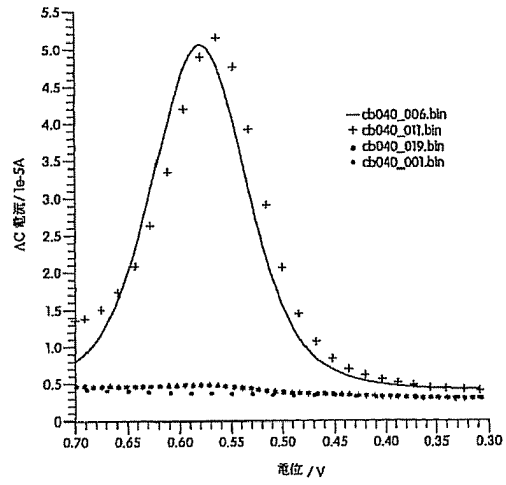
【図 22】



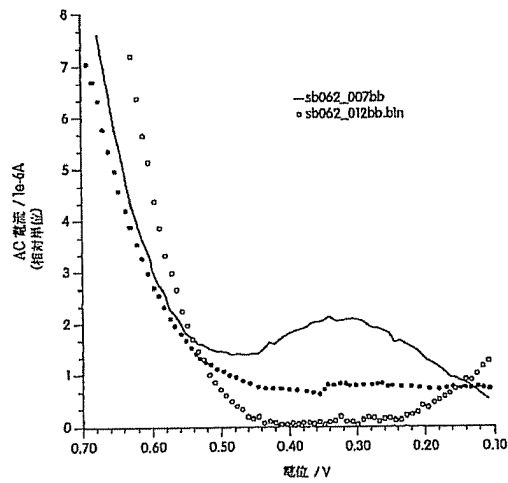
【図 2 3】



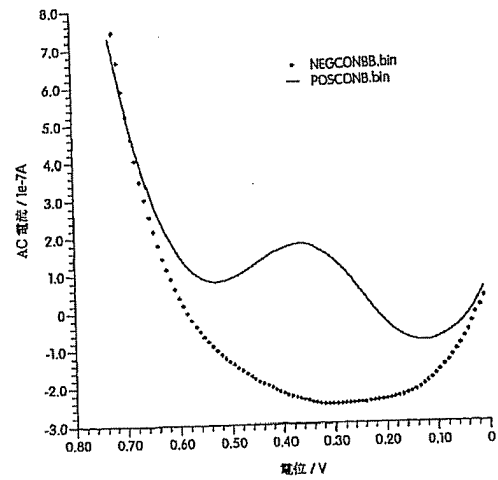
【図 2 4】



【図 2 5】

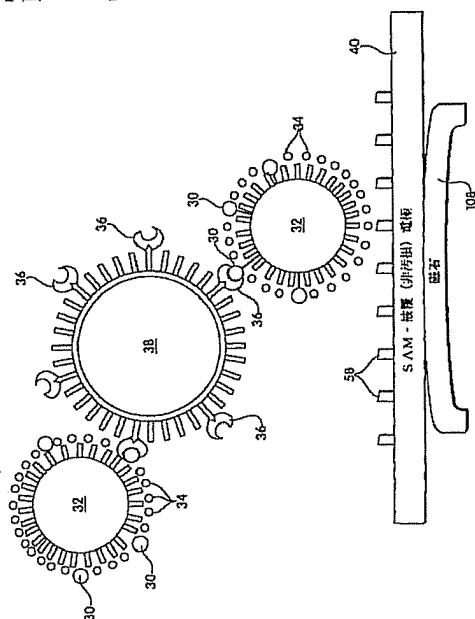


【図 2 6】

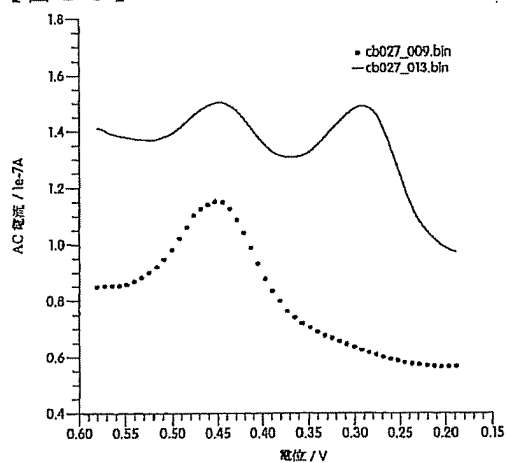




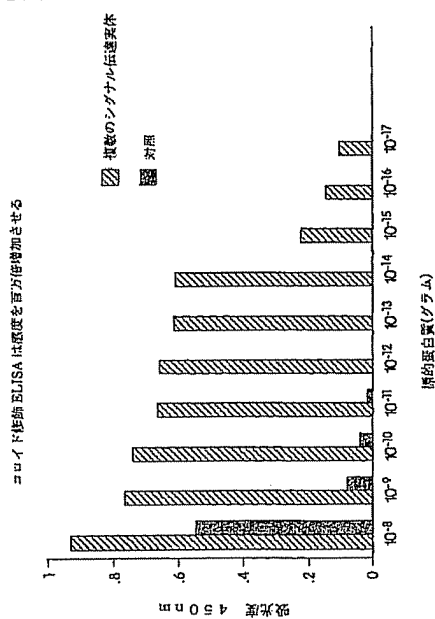
【図 27】



【図 28】



【図 31】



【図 32】

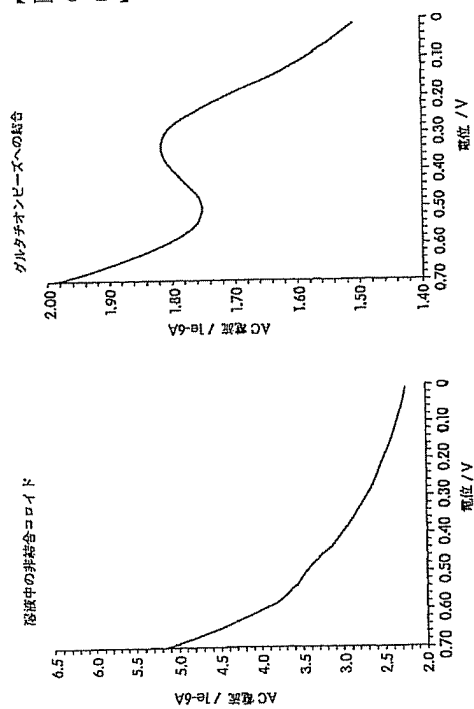


Fig. 32B

Fig. 32A

WO 02/01228 A2

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)



PCT

WO 02/01228 A2

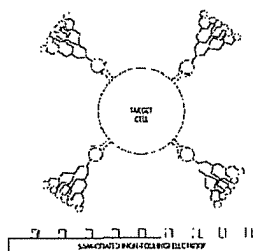
(N1) Designated States (initials): AU, AT, BE, BR, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, HU, IL, IN, JP, KE, KP, KR, KZ, LA, LU, LV, MA, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARUP (patent (GH, GL, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GR, GB, HU, IE, IL, IT, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GU, HT, MG, ML, MR, NE, NG, TD, TG,

without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INTERACTION OF COLLOID-MOBILIZED SPECIES WITH SPECIES ON NON-COLLOIDAL STRUCTURES



(57) Abstract: The invention provides novel techniques for derivatizing colloids with self-assembled monolayers. This provides the capability of a wide variety of assays including chemical or biochemical agent/sensor interaction studies. Bio derivatized colloids, with or without signaling entities, are used to probe interactions with species on non-colloidal structures. The invention provides techniques for immobilizing colloidal particles on a wide variety of non-colloidal structures. Included is the ability to generate a variety of non-colloidal structures including beads, with colloids on a detectable surface. This allows, in many cases, many detectable beads by the unaided human eye, as well as assays detectable via automated determination of a change in interaction of electromagnetic radiation with the colloids, e.g., absorption, light scattering, and the like.

WO 02/01228

PC17/US01/20168

Interaction of Colloid-Immobilized Species with  
Species on Non-Colloidal Structures

Field of the Invention

5 This invention relates generally to chemical and biochemical detection methods, and more particularly to techniques in which colloids bind to non-colloidal structures such as electrodes, beads, or cells, and to techniques in which multiple signals indicate a single binding event. Techniques including drug screening are facilitated by the invention.

10 Background of the Invention

Drug discovery is facilitated by screening large numbers of candidate compounds for interaction with target receptor or proteins under physiological conditions. Of particular importance are cell surface receptors or proteins. Many of the biomolecular interactions that promote tumorigenesis involve cell surface proteins that mediate both intra- and intercellular signaling. "Tumor markers" are molecules on the surface of a cell that are either exclusively expressed, or over-expressed, as a result of transformation to a neoplastic state. Some of these markers have been correlated with the ability of the tumor to invade tissues and display an aggressive course of growth characterized by metastases (these tumors generally are associated with a poor outcome for the patient). For example, the interaction between the cell surface receptor  $\alpha V\beta 3$  and the cell adhesion molecule vitronectin has been implicated in angiogenesis. See J. Varner *et al.*, "Integrins and cancer," *Curr Opin Cell Biol.* 8:724 (1996); B. Vaithe *et al.*, "In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to a  $\alpha V\beta 3$  integrin localization," *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 33:763 (1997); M. Horton, "The  $\alpha V\beta 3$  integrin 'vitronectin receptor,'" *Int J Biochem Cell Biol*, 29:721 (1997). Indeed, the increased concentration of this receptor on a melanoma cell has been correlated with a poor prognosis. Another example of a cell surface receptor that promotes tumorigenesis and/or angiogenesis is the MUC-1 onligen; this antigen is overexpressed on breast, prostate, lung and ovarian cancers.

30 The search for drugs to bind to and block cell surface receptors implicated in tumorigenesis has been technically challenging because there are few assays that work with intact cells. The ability to detect interactions between ligands and target receptors on the surface of live, intact cells, would enable the screening of candidate compounds to disrupt these interactions. Screening compound libraries for drugs that inhibit the action

WO 02/01228

PCT/US01/20368

- 2 -

of cell surface receptors depends critically on the receptors being in their native conformation and multimerization state throughout the drug screening process. According to current technologies, it is difficult or impossible to detect the interaction of cell surface receptors with their natural ligands.

5 Current technologies are limited in their ability to assay ligand interactions on cells. Fluorescence activated cell sorting (FACS) is one of the few techniques that enables the detection of cell surface receptors. One complication in using this technique to screen for drugs to block cell surface receptors is that: 1) the technique is sequential and cannot be readily multiplexed to facilitate massive drug screening; and 2) the  
10 technique is only feasible for detecting *antibodies* bound to the receptors; antibody antigen interactions are typically high affinity interactions that cannot be disrupted by drugs. According to current technologies, it is difficult or impossible to detect the interaction of cell surface receptors with their natural ligands. Screening compound libraries for drugs that inhibit the action of cell surface receptors depends critically on the  
15 receptors being in their native conformation and multimerization state, on the cell surface, throughout the drug screening process.

Another technique that can be used to query cell surface receptors is an ELISA assay. In this technique, cells are adhered to a 96-well plastic plate. A cognate antibody is allowed to bind to the cell surface receptor of interest and unbound antibody is washed  
20 away. The availability of the receptor is inferred by detecting the presence of the cognate antibody. The presence of bound antibody is detected by introducing a second antibody, conjugated to a detectable label, which is active against the *species* of the cognate antibody. There are several inherent problems which limit the usefulness of this technique for assessing the availability of cell surface proteins or for screening for drugs  
25 to block them: 1) the technique is plagued by false positives that result from the non-specific adsorption of antibodies to the plastic; 2) ligand-receptor interactions are often disrupted by the many washing steps; and most importantly, 3) antibodies rather than natural ligands must be used in this assay; because these are typically high affinity interactions, they cannot be readily disrupted by drugs that bind the receptor;  
30 additionally, unlike the natural ligand, the antibody may bind the target receptor at a site that does not disrupt the receptor's normal function.

WO 02/01228

PC17/US01/20368

- 3 -

What is needed is an approach for monitoring or controlling binding events between chemical or biological species that increases versatility and can increase sensitivity in a wide variety of specific interactions. For example, an approach for screening drugs against specific interactions of cell receptors and their ligands (including but not limited to the interaction of the  $\alpha V\beta 3$  receptor) would be advantageous. In the latter example, the assay should be flexible so as to permit screening against a wide variety of tumor types, and particularly invasive tumors. Importantly, the screening approach should permit the rapid screening of large numbers of candidate drugs.

#### Summary of the Invention

The present invention provides a variety of novel methods, compositions and species, and articles for monitoring (detecting) interactions between chemical or biological species including techniques useful for drug screening. Major aspects of the present invention include the following. Tools for proteomic studies including protein chips and particles for signaling interactions, and multi-particle systems such as two-particle systems. In multi-particle systems one particle can be a recruitable particle and the other particle can carry a binding partner of an agent presented by the recruitable particle and can also be a signaling entity or carry an auxiliary signaling entity. Another major area involves cell studies, especially techniques involving interactions between ligands and cell surface proteins and receptors. Discovery and therapeutics involving drugs that can effect these interactions also is described, with an emphasis on drug therapy involving angiogenesis. Specifically, cell receptor/ligand interactions that can inhibit or promote angiogenesis are described. Another area involves detecting proteins, either in solution or on the surfaces of intact cells, for diagnostic purposes.

In one aspect, the invention provides a method in which a colloid particle is given the ability to fasten to a non-colloidal structure, and then whether the colloid particle has fastened to the non-colloidal structure is determined. This aspect covers a wide range of interactions involving colloid particles or, preferably, many colloid particles with a variety of structures. Non-colloidal structures including beads, such as magnetic beads, can interact with colloid particles as an aid in determining interaction of species immobilized with respect to the bead with species immobilized with respect to the colloid particles. The colloid particles can "decorate" the beads, rendering them visibly identifiable as an indication of a particular species/species interaction. Alternatively,

WU 02/0122H

PCT/US91/20368

- 4 -

magnetic beads can be used to recruit colloid particles to a surface where identification of the particles can be made through electronic or electrochemical or other means, and the like. Non-colloidal structures such as electrodes can act with colloid particles or species immobilized on the colloid particles to indicate a particular assay result. Non-colloidal structures such as cells can interact with colloid structures to indicate binding of the cell to a species carried by the colloid particle. Advantages of these and other techniques involving colloid particles and a non-colloid structure will become even more apparent from the description that follows.

In another aspect the invention provides a technique for linking a chemical or biological agent to an article, such as a bead, colloid particle or the like, via a metal binding tag/metal chelate linkage. Articles linked in this way to chemical or biochemical species are included in the invention.

Another aspect of the invention involves a technique for the detection of ligand/protein interaction involving providing a ligand in fixed proximal relationship with an electroactive entity and determining interaction of the ligand with the protein by monitoring an electroactive signal given by the electroactive entity where the signal is dependent upon proximity of electroactive entity to the protein. This technique can be facilitated by an article of the invention which defines a first protein immobilized at a first surface, and a ligand suspected of interacting with the protein immobilized at a second surface, which may be a particle, along with an electroactive entity which also is immobilized at the second surface. This aspect of the invention facilitates one further feature of the invention that is a method for determining protein/ligand interaction in the absence of surface plasmon resonance without labeling either the protein or the ligand.

The invention also provides techniques and components that allow for a method of signaling a single binding of a first biological or chemical agent to a second biological or chemical agent with a plurality of signaling entities. An article provided by the invention facilitates this technique and it defines a first biological or chemical agent capable of biological or chemical binding to a second agent, linked to a plurality of signaling entities. The plurality of signaling entities can be linked to the agent by way of a polymer or dendrimer that carries a plurality of signaling entities and is adapted for linkage to an agent. The technique also can be facilitated by immobilizing the agent at a colloid particle, e.g. at the surface of a colloid particle at which a plurality of signaling

WU 0201228

PC17(US91)20168

- 5 -

entities are also immobilized. In preferred embodiments, more than three signaling entities signal a single chemical or biological binding event simultaneously. More preferably, at least 10, more preferably at least 50, and more preferably at least 1000 or 10,000 signaling entities signal a single chemical or biological binding event simultaneously according to this aspect of the invention.

Another aspect of the invention is defined by a colloid particle that has both a signaling entity and a protein immobilized thereupon. Techniques for use of this component also are included in the invention.

The invention also provides techniques for controlling the electronic permeability across a self-assembled monolayer at a surface. In the technique, a self-assembled monolayer is formed upon a surface and is defined by a mixture of at least a first molecular species and a second molecular species. The first molecular species has a structure that promotes the self-assembly at the surface in a tightly-packed manner that prevents fluid to which the surface is exposed from communication electrically with the surface. That is, the first species forms a relatively tightly-packed self-assembled monolayer (SAM) that seals the surface against fluids for the SAM is made up of only the first species. The SAM according to this aspect of the invention is made up of the first species and a second species that has a different molecular structure where the molecular structure causes disruption of the tightly-packed self-assembled structure thereby defining defects in the tightly-packed structure that allow fluid to which the surface is exposed to communicate electrically with the surface. In this context, the fluid communicates electrically with the surface by contacting the surface or coming in close enough proximity to the surface that electronic communication, via tunneling or the like, can occur. As will be seen from the description that follows, this aspect of the invention can be very useful in conjunction with other techniques of the invention.

As mentioned, one feature of the invention is that it provides a series of components and techniques for drug screening. The approach provides 1) a modular system for the attachment of natural ligands to universal signaling elements; 2) enhanced sensitivity of detection through the attachment of a plurality of signaling elements to each ligand; 3) a simpler format (without the need for washing steps, enzymatic cleavage and toxic substrates); 4) a convenient electronic output; and 5) the capability for multiplexing.

WO 02/01228

PCT/US01/70168

- 6 -

In one embodiment of the assay, the present invention contemplates immobilizing live, intact growing cells or cell-derived molecules, on conducting solid supports. Such cells or cell-derived molecules, having both surface molecules (e.g. receptors) and intracellular signaling proteins, are attached to solid supports that can either be surfaces or particle-like in nature. Ligands (or "binding partners") to these cells or cell-derived molecules, which can include both known and unknown ligands as well as putative drug candidates that are either unattached to other solid supports or attached to surfaces or particle-like structures, are allowed to interact with other cell-derived molecules in a manner such that binding between the two binding partners occurs and can be detected.

One of the binding partners or its attached support can additionally be derivatized with a substance that can be recognized and quantitated by a detection apparatus. This complex (through interaction) is then brought into the presence of the detection apparatus using characteristics of the associated complex that differentiate it from the unassociated binding partners.

In one embodiment, the cells are grown on a metal support (e.g. gold) that has been treated (e.g. coated with molecules compatible with cell growth) in a manner that preserves the conducting nature of the metal support. In one embodiment, a homogeneous conducting layer of molecules is attached to a metal surface that allows the conduction of electrons at a rate that is higher than a metal uniformly coated with insulating species of molecules (such as saturated alkyl thiolates). In another embodiment, a heterogeneous layer of molecules including a mixture of first a second species that allow fluid exposed to the surface to communicate electrically with the surface as described above. In another embodiment, a heterogeneous conducting layer of molecules is attached to a metal surface; the heterogeneous layer can be viewed as a lawn of low or non-conducting species (e.g. one such species or a plurality of such species) interrupted by conducting or high-conducting molecules (or "defects" in the lawn).

In a preferred embodiment of a heterogeneous conducting layer or heterogeneous layer allowing defects promoting fluid/surface electrocommunication, two types of molecules are attached to a metal surface: 1) alkyl thiol spacer molecules (terminated with either ethylene glycol units or methyl groups to inhibit non specific adsorption) are used to form the lawn and 2) a conducting species or defect-forming species. A conducting species can be readily identified by the experiments described below. In one



WU 02N122N

PC/T/US01/2036N

- 7 -

embodiment, the conducting species contains at least one ring structure (e.g. a benzene ring, a pyrimidine ring, etc.). In another embodiment, the conducting species contains no ring structure, but contains a group selected from  $-O_2$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$  and  $SH$ .

In one embodiment of a homogeneous conducting layer, only one type of molecule is attached to a metal surface, i.e. a conducting species. Other embodiments employing a plurality of conducting species are also contemplated. Further description of defect-forming molecules and other aspects of this arrangement are described below.

As noted above, the present invention contemplates both methods and compositions. In one embodiment, the present invention contemplates a composition, comprising a first molecule and one or more signaling elements (i.e. molecules or clusters of molecules which provide a signal that can be detected by any means, including but not limited to, detection by change in light transmission, change in solution color, change in charge, etc.) attached to a solid support, wherein said first molecule is a ligand and is capable of interacting with a protein or cell-surface receptor. In another embodiment, the present invention contemplates a composition, comprising a first molecule, a second molecule and a third molecule attached to a solid support, wherein said first molecule comprises a ligand capable of interacting with a protein or cell-surface receptor, wherein said second molecule forms a monolayer on said solid support, and wherein said third molecule is electroactive.

It is not intended that the present invention be limited by the nature of the solid support. In one embodiment, the solid support is a colloid (e.g. gold colloid). It is also not intended that the present invention be limited by the nature of attachment of the ligand to the solid support. In one embodiment, said ligand is covalently attached (directly or through another ligand or binding moiety) to the solid support. In another embodiment, the ligand is attached non-covalently or by electrostatic or ionic interaction.

The present invention contemplates a variety of signaling elements, including but not limited to fluorescent molecules and enzymes capable of acting on color-producing substrates. In a preferred embodiment, the present invention contemplates electroactive molecules that is, molecules having an oxidation/reduction potential that can be determined electronically or electrochemically proximate a working electrode of an appropriate, conventional electrical arrangement, as signaling elements. A preferred electroactive molecule is a metallocene. Metallocenes that can operate as electroactive

WU 020122H

PCT/US01/20368

- 8 -

signaling elements in accordance with the invention are known. One example of a particularly preferred electroactive molecule is one containing a ferrocene or a ferrocene derivative group or derivative, such as ferrocenyl thiol ( $C_{55}H_{44}FeS$ ); however, other organic complexes of transition metals are also contemplated as signaling elements.

5 It is not intended that the present invention be limited by the nature of the chemical or biochemical agent. A wide variety of agents and binding partners of those agents such as protein/protein, protein/peptide, antibody/antigen, antibody/hapten, enzyme/substrate, enzyme/inhibitor, enzyme/cofactor, binding protein/substrate, carrier protein/substrate, lectin/carbohydrate, receptor/hormone, receptor/effector, 10 complementary strands of nucleic acid, protein/nucleic acid repressor/inducer, ligand/cell surface receptor, virus/ligand, etc., can be used for binding interactions of the inventions. In one embodiment, the agent is a ligand, specifically a peptide. In a preferred embodiment, the peptide is derivatized with a moiety (such as a histidine tag) that can bind to a metal chelate. In this embodiment, it is convenient that the solid support 15 comprise a metal chelate and said peptide is attached to said solid support via binding of said moiety to said metal chelate.

In some embodiments, cell-derived molecules, including both cell-surface receptors and intracellular signaling proteins, exist on or are attached to solid supports that can either be surfaces or particle-like in nature. Binding partners of these cell- 20 derived proteins, which can include both known and unknown ligands as well as putative drug candidates, are attached to surfaces and/or particle-like structures, and are allowed to interact with the cell-derived proteins in a manner such that binding between the two binding partners occurs. One of the binding partners or its attached support can additionally be derivatized with a detectable substance. Interacting complexes are 25 identified using characteristics of the associated complex that differentiate it from the unassociated binding partners. The presence of, or a change in, a detectable moiety, that is either co-immobilized with one of the binding partners on a common solid support or directly attached to one of the binding partners, is detected. Molecules that disrupt a relevant interaction can be identified by detecting a loss of this signal. Interacting 30 partners are brought to a sensing apparatus by confining one of the binding partners to the sensing area and allowing it to recruit the other binding partner, or by manipulating characteristics of the associated complex that differentiate it from the unassociated

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 9 -

binding partners, or by attaching a recruitable element to one of the binding partners or its associated solid support.

For example, a chemical or biological binding partner can be attached to the surface of a solid support, which can be an electrode, a substantially planar article such as a common biotechnology chip, or the like. A binding partner of the chemical or biological agent can be attached to a colloid, and exposure of the colloid to the surface of the article results in binding of the binding partners thus immobilization of a colloid at the surface. This can be determined by determination of the colloid at the surface, specifically at a particular location of a surface. The colloid particle alternatively can include an auxiliary signaling entity that facilitates this determination (such as an electroactive signaling entity or a visual signaling entity such as a fluorescent tag).

Specifically, cell-derived molecules, such as proteins are attached to surfaces and ligands, as well as putative drug candidates are attached to particles, and are allowed to interact with the cell-derived proteins in a manner such that binding between the two binding partners occurs. One of the binding partners or its attached support can be derivatized with a detectable substance. Interacting partners are brought to a sensing apparatus by confining one of the binding partners to a sensing area and allowing it to recruit the other binding partner. Alternatively, one of the binding partners can be attached to a recruitable particle that may or may not display signaling entities.

One aspect of the invention involves recruiting an electronic signaling entity to an electrode using a magnetic material. This aspect can find use in many assays and other techniques of the invention. In the method, typically, a signaling entity is provided with the ability to become immobilized relative to the magnetic material (which can be a magnetic bead). The magnetic material and signaling entity can become immobilized relative to each other via a variety of chemical and/or physical linkages described herein. For example a first species may be immobilized relative to or fastened to a magnetic material and a second species may be immobilized relative to or fastened to the signaling entity or the first and second species can bind to each other. The first and second species can be essentially any species described herein or known in the art for binding, and in one embodiment are proteins. In a preferred embodiment, the proteins are not antibodies but are, for example, a ligand and a cognate receptor, etc. The signaling entity can be fastened to an intermediate entity, such as a colloid particle, to which one of the proteins

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 10 -

that acts as a binding partner also is listened. A signaling entity also can be recruited to an electrode without use of a magnetic material. In this arrangement the signaling entity can be immobilized with respect to a binding partner of a species with respect to the electrode, and the binding partners can be allowed to bind to each other. Essentially any  
5 binding partner interaction as described herein or known in the art can facilitate this technique.

Another aspect of the invention provides biotin-containing self-assembled monolayers on surfaces. In one embodiment the surfaces are surfaces of colloid particles.

10 Other advantages, novel features, and objects of the invention will become apparent from the following detailed description of the invention when considered in conjunction with the accompanying drawings, which are schematic and which are not intended to be drawn to scale. In the figures, each identical or nearly identical component that is illustrated in various figures is represented by a single numeral. For  
15 purposes of clarity, not every component is labeled in every figure, nor is every component of each embodiment of the invention shown where illustration is not necessary to allow those of ordinary skill in the art to understand the invention.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts ligands attached to a metal-containing compound, such as  
20 ferrocene, via dendrimers or polymers interacting with their cognate cell-surface receptors on intact cells.

Figure 2 depicts ligands and metal-containing compounds such as ferrocene attached to particles interacting with their cognate cell surface receptors on intact cells.

Figure 3 shows proteins attached to self-assembled monolayers on colloids that  
25 also present redox-active metals for electronic or electrochemical signaling. Cells bearing target receptors are incubated with colloids bearing a cognate ligand for the receptor of interest then electrophoretically or magnetically attracted to the sensing electrode. Note that the figure is not drawn to scale and the colloids can be made in a variety of sizes, ranging from 20 gold atoms to hundreds of nanometers in diameter.

30 Figure 4 shows cells bearing a tumor marker MUC-1 that are incubated with electronic signaling colloids that present the MUC-1 specific antibody, DP-3. The

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 11 -

antibody is attached to the colloid via a His-tagged protein G that is bound to NTA/Ni(II) groups that were incorporated into a self-assembled monolayer on the colloid.

Figure 5 shows one embodiment of an assay that can be used to screen drug libraries for the ability of their individual members to disrupt interactions with cell-surface proteins.

Figure 6 shows that a drug screening assay can be readily multiplexed by interfacing microwells (can be disposable) with a microelectrode array and robotics. Analysis of arrays of electrodes can be performed using a modified electrochemical analyzer capable of concurrent analysis of a plurality of electrodes. The electrodes can be configured so as to be inserted (see arrow) into the microwells.

Figure 7 shows that drug candidates can be synthesized on, or covalently attached to, particles that also bear electro-active signaling moieties. Drug candidates attached to signaling particles can be incubated with cells presenting the receptor of interest and control cells that did not express the receptor of interest. A drug-target interaction in this assay will result in a gain of signal.

Figure 8 shows a tissue specimen that is attached to a flexible, semi-permeable support via interaction with peptides containing RGD motifs. The specimen is then incubated with electro-active signaling colloids that bear a ligand for a cell-surface receptor of interest. The specimen is rinsed, then interfaced with a microelectrode array. The electrode array can be made such that the electrode dimensions are comparable to cell dimensions. The specimen is then characterized by ACV, which can then be correlated to histopathology.

Figure 9 shows a protein-protein interaction assay that is based on universal recruitment and signaling particles that can be easily multiplexed. Self-assembled monolayers bearing NTA/Ni(II) ligands that selectively capture His-tagged proteins are formed on signaling colloids and gold-coated magnetic beads. Each particle type is then briefly incubated with a different His-tagged protein. A magnetic field then attracts the magnetic bead to the sensing electrode. A signal is only transduced when the electro-active labels (which can be redox-active moieties) on the colloid are brought to the electrode through an interaction between a first protein and a second protein. Note that non-His-tagged proteins can also be attached to universal particles that bear self-assembled monolayers presenting carboxy-terminated thiols.

WO 02/01228

PCT/US91/20368

- 12 -

Figure 10 shows electro-active signaling colloids derivatized with thiols bearing enzyme cleavage sites (ECS) and terminated with biotin. Magnetic beads are derivatized with streptavidin, then the magnetic beads and signaling colloids are incubated with the enzyme of interest and drug candidates. If a drug candidate inhibited the action of the enzyme of interest then the site will not be cleaved and the signaling colloid will remain attached to the magnetic bead via the biotin-streptavidin interaction. When the resulting complexes are magnetically attracted to a sensing electrode, a current peak will result, making the assay a gain of signal detection assay.

Figure 11 shows a strategy for screening for drugs that modulate enzyme activity. In this scheme, a protein that is a target of enzyme modification is attached to a colloid that also bears an electro-active moiety. The chemical group that the enzyme adds to the target protein has been labeled with biotin. When the enzyme functions properly, the biotin-labeled compound is added to the protein on the signaling colloid. This resulting complex is then connected to a streptavidin-coated magnetic bead. The complex is then electromagnetically attracted to a sensing electrode. Drug candidates can be added to the assay. A loss of signal compared to controls would indicate that the drug candidate inhibited the enzyme's activity while a gain of signal would indicate that a drug enhanced the enzyme's activity.

Figure 12 shows the chemical structures of the farnesyl group, farnesyl pyrophosphate, and geranyl-geranyl pyrophosphate.

Figure 13 shows the modification of farnesyl- or geranyl-like moieties with a recognition group such as biotin.

Figure 14 shows farnesyl pyrophosphate derivatives bearing a biotin moiety. The farnesyl protein transferase (FPT) enzyme catalyzes the addition of the farnesyl derivative to RAS protein variants. The activity of the enzyme, or the ability of the drug candidate to modify enzyme activity can be quantitated by measuring current output when magnetic beads with streptavidin are used to recruit the complexes to the sensing electrode.

Figure 15 shows that drug candidates can be assessed for their ability to modulate enzyme activity. Each spatially addressable microwell contains a RAS protein (wild type or variant), the FPT enzyme, the biotin-modified addition group (farnesyl derivatives), magnetic beads bearing streptavidin, and plus or minus drug candidates. Electrodes can

WU 02/01228

UCT/US01/20168

- 13 -

then be analyzed by a variety of electronic and electrochemical techniques, including alternating current voltammetry (ACV).

Figure 16 shows a plot of an ACV analysis of the interaction of an RGD-containing ligand with cells grown on collagen-coated electrodes.

5 Figure 17 shows a plot of an ACV analysis of the interaction of an (negative) control ligand with cells grown on collagen-coated electrodes.

Figure 18 shows a plot of an ACV analysis of cells grown on a metal support comprising only a single type of conductive molecule.

10 Figure 19 shows a plot of an ACV analysis of the interaction of an RGD-containing ligand with cells grown on a metal support comprising a heterogeneous monolayer of insulating and conducting molecules.

Figure 20 is a photocopy of a photograph of colloid-decorated beads, specifically, colloids linked to beads via protein/protein interaction.

15 Figure 21 is a photocopy of a photograph of the negative control of the experiment shown in Figure 20.

Figure 22 shows a plot demonstrating the increase in conductivity of the monolayer as the percent of conducting molecules (in a lawn of insulating species) is increased.

20 Figure 23 shows a plot of an ACV analysis of the conductivity of a monolayer of conductive self-assembled monolayer containing a two-unit molecular wire poly (ethynylphenyl) thiol, ME1 shown against a negative control of a non-conductive self-assembled monolayer, as measured with a solution of ferrocene.

Figure 24 shows a plot of an ACV analysis of the conductivity of a monolayer of the two self-assembled monolayers of Figure 23, as measured against more highly-conductive monolayers, as measured with a solution of ferrocene.

25 Figure 25 shows ACV analysis of protein/protein interaction as measured by binding of a colloid to a magnetic bead.

Figure 26 shows ACV demonstration of enhanced electronic communication across a self-assembled monolayer, and redox signaling of protein immobilization to a cell surface, against a control.

30

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 14 -

Figure 27 is a schematic illustration of the assay, the plot of which is shown in Figure 25, of protein/protein interaction as measured by linkage of colloid to magnetic bead.

Figure 28 shows a plot of an ACV analysis an electrode containing surface-bound proteins and their affect on ferrocene oxidation potential (solid line), and negative control (dotted line).

Figures 29A and 29B are photocopies of photomicrographs (40X magnification) of cells decorated by colloids selectively at locations where receptor was expressed (29B) and control (29A).

Figures 30A and 30B are photocopies of computer-digitized microscope images of beads carrying non-specifically attached protein decorated by colloid particles carrying, on a self-assembled monolayer, the protein's binding partner (30A) and control (30B).

Figure 31 is a bar graph showing six order of magnitude improved signaling resulting from signaling a single binding event with a plurality of signaling entities.

Figures 32A and 32B show ACV plots of an experiment demonstrating the use of gravity to recruit a signaling entity indicating a binding interaction to a surface, and a control.

#### Detailed Description of the Invention

International patent application serial number PCT/US00/01997, filed 01/25/00 by Bamdad et al., entitled "Rapid and Sensitive Detection of Aberrant Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases" (published as WO 00/43791 on 07/27/00), International patent application serial number PCT/US00/01504, filed 01/21/00 by Bamdad, et al., entitled "Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures" (published as WO 00/34783 on 07/27/00), commonly-owned, copending U.S. patent application serial no. 09/602,778, filed 06/23/00 by Bamdad et al., entitled "Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures"; and commonly-owned, copending U.S. patent application serial no. 09/631,818, filed 08/03/00 by Bamdad et al., entitled "Rapid and Sensitive Detection of Protein Aggregation" all are incorporated herein by reference.

#### Definitions:

"Small molecule", as used herein, means a molecule less than 5 kiloDalton, more typically less than 1 kiloDalton. As used herein, "small molecule" excludes proteins.



WU 02/01228

UCTTUS01/20168

- 15 -

The term "candidate drug" as used herein, refers to any medicinal substance used in humans, animals, or plants. Encompassed within this definition are compound analogs, naturally occurring, synthetic and recombinant pharmaceuticals, hormones, antimicrobials, neurotransmitters, etc. This includes any substance or precursor (whether naturally occurring, synthetic or recombinant) which is to be evaluated for use as a drug for treatment of neurodegenerative disease, or other disease characterized by aberrant aggregation, or prevention thereof. Evaluation typically takes place through activity in an assay, such as the screening assays of the present invention.

A variety of types of particles can be used in the invention. For example, "fluid suspendable particle" means a particle that can be made to stay in suspension in a fluid in which it is used for purposes of the invention (typically an aqueous solution) by itself, or can be maintained in solution by application of a magnetic field, an electromagnetic field, agitation such as stirring, shaking, vibrating, sonicating, centrifuging, vortexing, or the like. A "magnetically suspendable" particle is one that can be maintained in suspension in a fluid via application of a magnetic field. An electromagnetically-suspendable particle is one that can be maintained in suspension in a fluid by application of an electromagnetic field (e.g., a particle carrying a charge, or a particle modified to carry a charge). A "self-suspendable particle" is a particle that is of low enough size and/or mass that it will remain in suspension in a fluid in which it is used (typically an aqueous solution), without assistance of for example a magnetic field, for at least 1 hour. Other self-suspendable particles will remain in suspension, without assistance, for 5 hours, 1 day, 1 week, or even 1 month, in accordance with the invention.

"Proteins" and "peptides" are well-known terms in the art, and are not precisely defined in the art in terms of the number of amino acids that each includes. As used herein, these terms are given their ordinary meaning in the art. Generally, peptides are amino acid sequences of less than about 100 amino acids in length, but can include sequences of up to 300 amino acids. Proteins generally are considered to be molecules of at least 100 amino acids.

As used herein, a "metal binding tag" refers to a group of molecules that can become fastened to a metal that is coordinated by a chelate. Suitable groups of such molecules include amino acid sequences including, but not limited to, histidines and

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 16 -

cysteines ("polyamino acid tags"). Metal binding tags include histidine tags, defined below.

As used herein, "chelate coordinating a metal" or metal coordinated by a chelate, refers to a metal coordinated by a chelating agent that does not fill all available  
5 coordination sites on the metal, leaving some coordination sites available for binding via a metal binding tag.

As used herein, "metal binding tag/metal/chelate linkage" defines a linkage between first and second species in which a first species is immobilized relative to a metal binding tag and a second species is immobilized relative to a chelate, where the  
10 chelate coordinates a metal to which the metal binding tag is also coordinated. U.S. Patent No. 5,620,850 of Bamdad, et al., incorporated herein by reference, describes exemplary linkages.

"Signaling entity" means an entity that is capable of indicating its existence in a particular sample or at a particular location. Signaling entities of the invention can be  
15 those that are identifiable by the unaided human eye, those that may be invisible in isolation but may be detectable by the unaided human eye if in sufficient quantity (e.g., colloid particles), entities that absorb or emit electromagnetic radiation at a level or within a wavelength range such that they can be readily detected visibly (unaided or with a microscope including an electron microscope or the like), or spectroscopically, entities  
20 that can be detected electronically or electrochemically, such as redox-active molecules exhibiting a characteristic oxidation/reduction pattern upon exposure to appropriate activation energy ("electronic signaling entities"), or the like. Examples include dyes, pigments, electroactive molecules such as redox-active molecules, fluorescent moieties (including, by definition, phosphorescent moieties), up-regulating phosphors,  
25 chemiluminescent entities, electrochemiluminescent entities, or enzyme-linked signaling moieties including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase. "Precursors of signaling entities" are entities that by themselves may not have signaling capability but, upon chemical, electrochemical, electrical, magnetic, or physical interaction with another species, become signaling entities. An example includes a chromophore having the  
30 ability to emit radiation within a particular, detectable wavelength only upon chemical interaction with another molecule. Precursors of signaling entities are distinguishable from, but are included within the definition of, "signaling entities" as used herein.

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 17 -

As used herein, "fastened or adapted to be fastened", in the context of a species relative to another species or to a surface of an article, means that the species is chemically or biochemically linked via covalent attachment, attachment via specific biological binding (e.g., biotin/streptavidin), coordinative bonding such as chelate/metal binding, or the like. For example, "fastened" in this context includes multiple chemical linkages, multiple chemical/biological linkages, etc., including, but not limited to, a binding species such as a peptide synthesized on a polystyrene bead, a binding species specifically biologically coupled to an antibody which is bound to a protein such as protein A, which is covalently attached to a bead, a binding species that forms a part (via genetic engineering) of a molecule such as GST or Phage, which in turn is specifically biologically bound to a binding partner covalently fastened to a surface (e.g., glutathione in the case of GST), etc. As another example, a moiety covalently linked to a thiol is adapted to be fastened to a gold surface since thiols bind gold covalently. Similarly, a species carrying a metal binding tag is adapted to be fastened to a surface that carries a molecule covalently attached to the surface (such as thiol/gold binding) which molecule also presents a chelate coordinating a metal. A species also is adapted to be fastened to a surface if a surface carries a particular nucleotide sequence, and the species includes a complementary nucleotide sequence.

"Covalently fastened" means fastened via nothing other than one or more covalent bonds. E.g. a species that is covalently coupled, via EDC/NHS chemistry, to a carboxylate-presenting alkyl thiol which is in turn fastened to a gold surface, is covalently fastened to that surface.

As used herein, a component that is "immobilized relative to" another component either is fastened to the other component or is indirectly fastened to the other component, e.g., by being fastened to a third component to which the other component also is fastened, or otherwise is translationally associated with the other component. For example, a signaling entity is immobilized with respect to a binding species if the signaling entity is fastened to the binding species, is fastened to a colloid particle to which the binding species is fastened, is fastened to a dendrimer or polymer to which the binding species is fastened, etc. A colloid particle is immobilized relative to another colloid particle if a species fastened to the surface of the first colloid particle attaches to an entity, and a species on the surface of the second colloid particle attaches to the same

WO 02/01224

PCT/US01/20168

- 18 -

entity, where the entity can be a single entity, a complex entity of multiple species, a cell, another particle, etc. All entities that can be fastened or adapted to be fastened to other entities of the invention also can be immobilized or adapted to be immobilized to the other entities, and vice versa.

5 "Specifically fastened" or "adapted to be specifically fastened" means a species is chemically or biochemically linked to another specimen or to a surface as described above with respect to the definition of "fastened to or adapted to be fastened", but excluding all non-specific binding.

10 "Non-specific binding", as used herein, is given its ordinary meaning in the field of biochemistry.

"Colloids", as used herein, means nanoparticle, i.e. very small, self-suspendable particles including inorganic, polymeric, and metal particles. Typically, colloid particles are of less than 250 nm cross section in any dimension, more typically less than 100 nm cross section in any dimension, and preferably 10-30nm, and can be metal, non-metal, 15 crystalline or amorphous. As used herein this term includes the definition commonly used in the field of biochemistry, and it typically means gold colloid particles.

A "moiety that can coordinate a metal", as used herein, means any molecule that can occupy at least two coordination sites on a metal atom, such as a metal binding tag or a chelate.

20 "Diverse biological species" means different animals, such as mouse and hamster, mouse and goat, etc.

The term "sample" refers to any cell, tissue, or fluid from a biological source (a "biological sample"), or any other medium, biological or non-biological, that can advantageously be evaluated in accordance with the invention including, but not limited to, a biological sample drawn from a human patient, a sample drawn from an animal, a 25 sample drawn from food designed for human consumption, a sample including food designed for animal consumption such as livestock feed, milk, an organ donation sample, a sample of blood destined for a blood supply, a sample from a water supply, or the like. One example of a sample is a sample drawn from a human or animal to whom a 30 candidate drug has been given to determine the efficacy of the drug.

A "sample suspected of containing" a particular component means a sample with respect to which the content of the component is unknown. For example, a fluid sample

WU 02/0122H

PCT/US91/20368

- 19 -

from a human suspected of having a disease, such as a neurodegenerative disease or a non-neurodegenerative disease, but not known to have the disease, defines a sample suspected of containing neurodegenerative disease aggregate-forming species. "Sample" in this context includes naturally-occurring samples, such as physiological samples from humans or other animals, samples from food, livestock feed, etc., as well as "structurally predetermined samples", which are defined herein to mean samples, the chemical or biological sequence or structure of which is a predetermined structure used in an assay designed to test whether the structure is associated with a particular process such as a neurodegenerative disease. For example, a "structurally predetermined sample" includes a peptide sequence, random peptide sequence in a phage display library, and the like. Typical samples taken from humans or other animals include cells, blood, urine, ocular fluid, saliva, cerebro-spinal fluid, fluid or other samples from tonsils, lymph nodes, needle biopsies, etc.

As used herein, a "metal binding tag" refers to a group of molecules that can become fastened to a metal that is coordinated by a chelate. Suitable groups of such molecules include amino acid sequences, typically from about 2 to about 10 amino acid residues. These include, but are not limited to, histidines and cysteines ("polyamino acid tags"). Such binding tags, when they include histidine, can be referred to as a "poly-histidine tract" or "histidine tag" or "HIS-tag", and can be present at either the amino- or carboxy-terminus, or at any exposed region, of a peptide or protein or nucleic acid. A poly-histidine tract of six to ten residues is preferred for use in the invention. The poly-histidine tract is also defined functionally as being a number of consecutive histidine residues added to a protein of interest which allows the affinity purification of the resulting protein on a metal chelate column, or the identification of a protein terminus through the interaction with another molecule (e.g. an antibody reactive with the HIS-tag).

"Affinity tag" is given its ordinary meaning in the art. Affinity tags include, for example, metal binding tags, GST (in GST/glutathione binding clip), and streptavidin (in biotin/streptavidin binding). At various locations herein specific affinity tags are described in connection with binding interactions. It is to be understood that the invention involves, in any embodiment employing an affinity tag, a series of individual embodiments each involving selection of any of the affinity tags described herein.

WO 02/01228

PC/T/US91/20168

- 20 -

"Molecular wires" as used herein, means wires that enhance the ability for a fluid encountering a SAM-coated electrode to communicate electrically with the electrode. This includes conductive molecules or, as mentioned above and exemplified more fully below, molecules that can cause defects in the SAM allowing communication with the electrode. A non-limiting list of additional molecular wires includes 2-mercaptopyridine, 2-mercaptobenzothiazole, dithiothreitol, 1, 2-benzenedithiol, 1, 2-benzenedimethanethiol, benzene-ethanethiol, and 3-mercaptopropylether. Conductivity of a monolayer can also be enhanced by the addition of molecules that promote conductivity in the plane of the electrode. Conducting SAMs can be composed of, but are not limited to: 1) poly (ethynylphenyl) chains terminated with a sulfur; 2) an alkyl thiol terminated with a benzene ring; 3) an alkyl thiol terminated with a DNA base; 4) any sulfur terminated species that packs poorly into a monolayer; 5) all of the above plus or minus alkyl thiol spacer molecules terminated with either ethylene glycol units or methyl groups to inhibit non specific adsorption. Thiols are described because of their affinity for gold in ready formation of a SAM. Other molecules can be substituted for thiols as known in the art from U.S. Patent No. 5,620,820, and other references. Molecular wires typically, because of their bulk or other conformation, creates defects in an otherwise relatively tightly-packed SAM to prevent the SAM from tightly sealing the surface against fluids to which it is exposed. The molecular wire causes disruption of the tightly-packed self-assembled structure, thereby defining defects that allow fluid to which the surface is exposed to communicate electrically with the surface. In this context, the fluid communicates electrically with the surface by contacting the surface or coming in close enough proximity to the surface that electronic communication via tunneling or the like, can occur.

The term "biological binding" refers to the interaction between a corresponding pair of molecules that exhibit mutual affinity or binding capacity, typically specific or non-specific binding or interaction, including biochemical, physiological, and/or pharmaceutical interactions. Biological binding defines a type of interaction that occurs between pairs of molecules including proteins, nucleic acids, glycoproteins, carbohydrates, hormones and the like. Specific examples include antibody/antigen, antibody/hapten, enzyme/substrate, enzyme/inhibitor, enzyme/cofactor, binding protein/substrate, carrier protein/substrate, lectin/carbohydrate, receptor/hormone,

WU 02/0122H

PC-T/US01/2016H

- 21 -

receptor/effector, complementary strands of nucleic acid, protein/nucleic acid repressor/inducer, ligand/cell surface receptor, virus/ligand, etc.

The term "binding partner" refers to a molecule that can undergo binding with a particular molecule. Biological binding partners are examples. For example, Protein A is a binding partner of the biological molecule IgG, and vice versa. .

The term "determining" refers to quantitative or qualitative analysis of a species via, for example, spectroscopy, ellipsometry, piezoelectric measurement, immunoassay, electrochemical measurement, and the like. "Determining" also means detecting or quantifying interaction between species, e.g. detection of binding between two species.

The term "self-assembled monolayer" (SAM) refers to a relatively ordered assembly of molecules spontaneously chemisorbed on a surface, in which the molecules are oriented approximately parallel to each other and roughly perpendicular to the surface. Each of the molecules includes a functional group that adheres to the surface, and a portion that interacts with neighboring molecules in the monolayer to form the relatively ordered array. See Laibinis, P. B.; Hickman, J.; Wrighton, M. S.; Whitesides, G. M. *Science* 245, 845 (1989), Bain, C.; Evall, J.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7155-7164 (1989), Bain, C.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7164-7175 (1989), each of which is incorporated herein by reference.

The term "self-assembled mixed monolayer" refers to a heterogeneous self-assembled monolayer, that is, one made up of a relatively ordered assembly of at least two different molecules.

In one aspect, the present invention contemplates interaction between chemical or biological agents for analysis, drug screening, or the like. The invention includes but is not limited to analyzing and/or inhibiting ligand interactions, including but not limited to ligands on intact cells (growing on an electrode, or in solution or in suspension). The present invention contemplates a variety of embodiments, including the use of drug candidates, known or putative ligands, and small molecule drug libraries.

In one embodiment, cells are grown on electrodes that may or may not be derivatized with self-assembled monolayers (SAMs). Putative ligands (e.g. for a particular cell-surface receptor) are immobilized on a solid support (e.g. gold colloids) along with signaling elements (e.g. electroactive complexes). These derivatized solid supports are incubated with the cells immobilized on a sensing electrode (e.g. metal

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 22 -

support). The interaction between the target receptor and the ligand on the solid support (e.g. colloid-bound ligand) tethers the co-immobilized signaling elements near the sensing electrode. While not limited to any particular mechanisms, it is believed that, as a potential is applied to the electrode, the nearby redox-active metal complexes go through their characteristic oxidation potential and eject electrons. When an oscillating component is added on top of the voltage ramp, many electrons are ejected by each metal complex and can be detected as current output. A form of this sort of electrochemical analysis is called alternating current voltammetry (ACV). As would be known by those of ordinary skill in the art, as used herein, "cell-surface receptor" is a generic term encompassing also cell surface proteins.

Certain embodiments of the invention make use of self-assembled monolayers (SAMs) on surfaces, such as surfaces of colloid particles, and articles such as colloid particles having surfaces coated with SAMs. In one set of preferred embodiments, SAMs formed completely of synthetic molecules completely cover a surface or a region of a surface, e.g. completely cover the surface of a colloid particle. "Synthetic molecule", in this context, means a molecule that is not naturally occurring, rather, one synthesized under the direction of human or human-created or human-directed control. "Completely cover" in this context, means that there is no portion of the surface or region that directly contacts a protein, antibody, or other species that prevents complete, direct coverage with the SAM. I.e. in preferred embodiments the surface or region includes, across its entirety, a SAM consisting completely of non-naturally-occurring molecules (i.e. synthetic molecules). The SAM can be made up completely of SAM-forming species that form close-packed SAMs at surfaces, or these species in combination with molecular wires or other species able to promote electronic communication through the SAM (including defect-promoting species able to participate in a SAM), or other species able to participate in a SAM, and any combination of these. Preferably, all of the species that participate in the SAM include a functionality that binds, optionally covalently, to the surface, such as a thiol which will bind to a gold surface covalently. A self-assembled monolayer on a surface, in accordance with the invention, can be comprised of a mixture of species (e.g. thiol species when gold is the surface) that can present (expose) essentially any chemical or biological functionality. For example, they can include tri-ethylene glycol-terminated species (e.g. tri-ethylene



WQ 02/0122H

PC/TUS01/2016H

- 23 -

glycol-terminated thiols) to resist non-specific adsorption, and other species (e.g. thiols) terminating in a binding partner of an affinity tag, e.g. terminating in a chelate that can coordinate a metal such as nitrilotriacetic acid which, when in complex with nickel atoms, captures a metal binding tagged-species such as a histidine-tagged binding species. The present invention provides a method for rigorously controlling the concentration of essentially any chemical or biological species presented on a colloid surface or any other surface. In many embodiments of the invention the self-assembled monolayer is formed on gold colloid particles. The present invention provides a method for rigorously controlling the concentration of the histidine-tagged peptides presented on the colloid surface. Without this rigorous control over peptide density on each colloid particle, co-immobilized peptides would readily aggregate with each other to form micro-hydrophobic-domains that would catalyze colloid-colloid aggregation in the absence of aggregate-forming species present in a sample. This is an advantage of the present invention, over existing colloid agglutination assays.

The methods described in the present invention produce self-assembled monolayers on colloids that resist non-specific adsorption without protein blocking steps, such as blocking with BSA. The methods described herein also produce derivatized colloids that are stable in biologically relevant fluids and do not require detergents (for stability; maintaining colloids in suspension), which interfere with binding reactions. This allows sensitive binding assays to be performed in solution. This abrogates the need for having binding partners adhered to adsorbent surfaces, as is common for existing colloid agglutination assays. As is discussed below, detergent can advantageously be used for SAM formation on colloids. In this case, detergent can be and preferably is removed after SAM formation and is no longer present on the colloid, in the SAM, or elsewhere during binding interactions or other use of the colloids.

It is not intended that the present invention be limited to embodiments wherein the cells are bound directly to a metal support (e.g., electrodes). Embodiments are contemplated wherein the cells are indirectly bound through the interaction of ligands attached to the metal support. That is to say, cells can also be recruited to a surface by coating that surface with molecules that directly or indirectly bind to cells, by specific or nonspecific interactions. For example, methyl-terminated self-assembled monolayers (SAMs) bind collagen non-specifically, which in turn binds cells non-specifically.

WO 02/01224

PCT/US91/20168

- 24 -

Alternatively, peptides that contain an arginine, glycine, aspartate (RGD) motifs, mimic vitronectin and bind specific cell types, like endothelial cells. Similarly, polylysine, positive charge, Kringle domains, integrins, and peptide, or molecular mimics of the same, can be bound to surfaces for the attachment of cells. These ligands can be displayed on a surface by incorporation into SAMs. The ligands themselves need not be directly incorporated into the SAM. SAMs that display a binding partner for an affinity tag attached to the ligand may be used. For example, peptides modified with a histidine tag can be easily attached to SAMs that contain a nitrilo tri-acetic acid (NTA) - nickel thiol. Alternatively, glutathione S-transferase fusion proteins can be attached to a SAM that incorporates glutathione or a derivative thereof. One advantage of using a metal electrode is that many known functional groups can be provided at the terminus of molecules that will form a SAM on the surface.

Cells in solution, for example, can be attracted to a detecting electrode by electrophoresis. Specifically, cell-derived molecules can be bound to a ligand(s) that are attached to a colloid that also displays electro-active compounds such as ferrocene derivatives to aid in the detection of the bound complex. However, the detection element used can be any charged, electro-active species or fluorescent tag that can be easily detected or the colloid itself.

Signaling entities are used in a variety of assays and arrangements of the invention. It is to be understood that any of a variety of signaling entities can be selected in each case, including a dye, pigment, electroactive molecule, fluorescent moiety, up-regulating phosphor, enzyme-linked signaling moiety including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase, chemiluminescent moiety, electrochemiluminescent moiety, etc. See for example, Knight, "Trends in Analytical Chemistry", vol. 18, 1999, pg. 47; Knight, et al., *Analyst*, vol. 119, 1994, page 879; Stults, et al., "Use of Recombinant Biotinylated Aequorin in Microtiter and Membrane-Based Assays: Purification of Recombinant Apoaequorin from *escheria coli*", *Biochemistry*, 1992, 31, 1433; Mengeling, et al., "A Microplate Assay for Analysis for Solution-Phase Glycosyltransferase Reactions: Determination of Kinetic Constants", *Analytical Biochemistry*, 119, 286, (1991). A variety of signaling entities can be immobilized relative to surfaces of articles such as beads or colloid particles, if desired. Signaling entities presented on any of these can be fluorescent molecules. Fluorescent-conjugated

WU 02/1228

PC17/US01/20368

- 25 -

antibodies and other fluorescent fusion proteins, including green fluorescent proteins, are widely used in biomedical research and testing. These fluorescent proteins and molecules can easily be attached to gold colloids that also present putative binding partners either through affinity tags, EDC/NHS chemistry or by binding to a His-tagged protein A or G presented on NTA-SAM-coated colloids according to the invention. Signaling entities such as fluorescent moieties also can be co-immobilized on a colloid via a biotin terminated ligand, or may be fastened via a chelate/metal/metal binding tag linkage. A fluorescent moiety may also be fastened by attaching it to an antibody and using a chelate/metal/metal binding tag with His-protein G to bind the antibody. The moieties can then be directly detected.

The ligand derivatized colloids can be tethered near an electrode that may or may not be modified with a self-assembled monolayer (SAM) and can detect the bound cells by perturbations in the electrode current induced by the binding. Cell-derived proteins can also be bound to a ligand(s) that is attached to a magnetic bead. Alternatively, cell-derived proteins can also be bound to a ligand(s) on an electroactive dendrimer. Additionally, cell-derived proteins can be bound with a ligand(s) that is attached to a polymer that also displays electro-active or redox-active complexes. Cell-derived proteins can also be bound with a ligand(s) that is attached to a conducting polymer that also displays electro-active or redox-active complexes.

In an alternative scheme, the described system can make use of two different ligands. One ligand, which binds to a constitutively expressed cell surface receptor, can be immobilized on a magnetic bead and used to recruit the cell to a sensing electrode. A second ligand which recognizes the cell surface receptor of interest is attached to a signaling colloid.

In another alternative scheme, the described system can make use of two distinguishable electro-active complexes, such as two ferrocene derivatives that oxidize at different potentials. The first ferrocene derivative can be directly or indirectly attached to a ligand for the cell-surface receptor of interest. A second ferrocene derivative is directly or indirectly attached to a second ligand that binds to a constitutively expressed cell surface receptor. In this way, the ratio of the two signals can be used to calibrate the level of induction of a cell-derived molecule (e.g. protein) that is induced by a physiological, environmental, or disease-associated change in expression. This

W/O 0201228

PCT/US91/20368

- 26 -

comparison of expression ratios can also be done by having both ligands carry the same metal complex but incubating separate aliquots of the sample on separate electrode pads.

The present invention contemplates the attachment of ligands (including but not limited to putative drug candidates) to a surface that can be particle-like and interact  
5 them with cell-derived proteins, e.g. cell surface proteins, that can be attached to supports or left intact on cells in an effort to identify binding partners, determine their presence or absence, and quantify their levels. Specifically, intact cells that present cell surface receptors can be used as the first binding partner. Known or putative ligands attached directly or indirectly to signaling entities act as the second binding partner.  
10 Alternatively, cell-derived proteins can be bound to a surface, and their ligand or binding partner attached to a particle that has signaling capability, such as a colloid or derivatized colloid. Drug candidates can be added to facilitate drug screening through disruption of the interaction. This method is also very useful in diagnostics. A protein or antibody can be immobilized on a surface, and a sample suspected of containing a binding partner  
15 to this protein can be incubated with the sample to facilitate binding, and the rest of the sample can be washed away. A particle bearing a ligand to the binding partner and a signaling capability can be added. If the sample contains the binding partner, the particle will be indirectly bound to the surface to give a signal. The surfaces can be reusable particles. Attachments can be direct or indirect, i.e., attachments can involve  
20 two entities becoming immobilized with respect to each other. Particles can display immobilized antibodies, e.g., histidine-tagged Protein G to which antibodies bind, and the antibodies can recognize a common ligand, or can contain proteins that recognize each other.

One general technique of the invention involves using magnetic beads to recruit  
25 an electronic or electrochemical signaling entity to the surface of an electrode indicating capture of a binding moiety (a biological or chemical agent) by a binding partner. Referring to Figure 27, a first species 30 is attached to a colloidal particle 32 that also has a signaling capability such as the metallocene ferrocene, 34. A second species 36, which is suspected of being a binding partner of 30 is attached to a magnetic particle 38  
30 that cannot signal, but can be magnetically attracted to an electrode 40. In one particularly useful technique species 30 and a second species 36 are proteins, thus the invention finds particular use in the field of proteomics. The technique is an example of

WU 02/0122H

PCT/US91/2016H

- 27 -

an aspect of the invention involving allowing a colloid particle 32 the ability to fasten to non-colloidal structure, magnetic bead, 38. Determining fastening of the colloid particle to the non-colloidal structure is carried out by drawing the magnetic bead to the electrode and determining whether the colloid particle is also proximate the electrode, or  
5 unattached. Specifically, the two components are incubated together in solution and resultant complexes are magnetically attracted to the electrode. Electrodes are then analyzed by Alternating Current Voltammetry (ACV). (Laviron B: *J Electro Anal Chem.*, 1979, 105: 35). Current is plotted, in real time, as a function of voltage. If the electronic or electrochemical signaling moiety on the first component is brought very close to the  
10 electrode, a distinctive current peak will occur at a characteristic potential. If the two proteins interact with each other, then when the magnetic particle is attracted to the sensing electrode, it will also carry the colloidal particle, with the signaling capability, with it. Because the first component is a small gold colloid, it will remain in suspension unless it is specifically recruited to the sensing electrode via an interaction with the first  
15 species on the colloidal particle and the second species attached to the magnetic particle. An electronic or electrochemical signal will only be generated if the signaling particle has been connected to the magnetic particle through an interaction between the first species and the second species. In this embodiment, the colloid particle comprises an auxiliary signaling entity, exemplified by ferrocene. In other embodiments described  
20 below, the colloid particle is itself a signaling entity and no auxiliary entity is required.

This strategy can be used to rapidly screen for protein-protein interactions in array format. When searching for potential therapeutic targets, researchers often need to identify a binding partner for a particular protein. The known protein can be attached to a magnetic bead. This can be accomplished by direct chemical coupling of the known  
25 protein to commercially available magnetic beads that present chemical functional groups, by attaching to a protein A-coated magnetic bead via a cognate antibody, or by attaching a histidine-tagged version of the known protein to a gold-coated magnetic bead that has been derivatized with an NTA-SAM (see, for example, U.S. Patent No. 5,620,850, incorporated herein by reference). Potential binding partners can be  
30 expressed as histidine-tagged proteins then separately attached to NTA-SAM-coated colloids that also present a ferrocene moiety. Each well of a multi-well array, interfaced with an electrode array, will contain the known protein on a magnetic bead. Distinct

WU 02/0122H

CC17/US91/2036H

- 28 -

putative binding partners attached to signaling colloids can be separately added to each well. Resultant complexes can then be magnetically attracted to the electrodes to determine which of the candidate proteins, bound the known protein. The known species need not necessarily be a protein. When binding partners have been identified, drug candidates can be added to the assay to disrupt the interaction.

Alternatively, biological or chemical agent 30 is a drug candidate and its binding partner (potential binding partner) 36 is a target of a drug candidate or vice versa. Specifically, drug candidates can be attached to the magnetic particles and the known target species attached to signaling colloids, to identify drug candidates that bind to a medically relevant target species. Or, species 30 and 36 can be a target and ligand to the target, respectively, and the technique can involve bringing the colloid 32 and magnetic bead 38 into proximity to allow fastening of 30 to 36 in the presence of a candidate drug for interruption of binding of the ligand to the target. As will be seen below, this technique can be applied to interaction of a colloid with a variety of non-colloidal structures.

Advantages of this technology over existing methods such as ELISA, fluorescent labeling and SPR include: In this system, there is no need for protein labeling; the protein is attached to a labeled component. Gold colloids can be pre-labeled with both: a) a signaling moiety; and b) a functional group for protein attachment. Self-assembled monolayers that present both NTA/ $\text{Ni}^{2+}$ , to capture histidine-tagged proteins, and a ferrocene derivative, for electronic or electrochemical signaling, can be formed on the colloids. SAMs that incorporate carboxylic acid groups, for the chemical coupling (standard EDC/NHS chemistry) of unmodified proteins, can also be used. The technology is modular. Virtually any biological species can be co-immobilized on colloids with a signaling entity. The technology enables cost-effective multiplexing as it can readily be multiplexed on microelectrode arrays.

Liposomes can also incorporate the first binding partner 30. As above, the signaling itself can be incorporated into the liposome or lipids can be incorporated into the liposomes in order to capture His-tagged soluble receptors after liposome formation. The liposomes can contain photoactivatable groups that allow for UV-activated cross linking after liposome formation in order to give increased stability.

WU 02/0122H

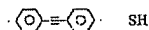
PCT/US91/2016H

- 29 -

Identification of drug candidates can also be accomplished by using a competitive inhibition assay. Specifically, a drug candidate free in solution can be separately incubated with the composition. Competitive inhibition to the target cell-derived protein occurring by drug binding to receptor or ligand can be observed as a time or dosage dependent loss of detection signal.

Doing this requires a method of directly or indirectly attaching a signaling moiety to a known ligand and then provided a method of attaching or recruiting the complex binding partners to a sensing surface. The former is described above while the latter is described below.

The sensing surface used can take various forms. However, for illustration purposes, methods for recruiting the binding partner complex are described that use an electrode that is modified with a conducting SAM. A conducting SAM is a layer of molecules attached to a metal surface that allows the conduction of electrons at a rate that is higher than a metal uniformly coated with an insulating species such as saturated alkyl thiolates. A preferred pathway for electron conduction can be provided by a monolayer into which molecular wires (polymers of aromatic ring compounds) have been incorporated. A variety of molecules can be used for this purpose, including but not limited to poly (ethynylphenyl thiol) (i.e.  $C_{14}H_{10}S$ ), referred to herein as MP1.:



"Molecular wires" as used herein, means wires that enhance the ability for a fluid encountering a SAM-coded electrode to communicate electrically with the electrode. This includes conductive molecules or, as mentioned above and exemplified more fully below, molecules that can cause defects in the SAM allowing fluid contact with the electrode. A non-limiting list of additional molecular wires includes 2-mercaptopyridine, 2-mercaptobenzothiazole, dithiothreitol, 1, 2-benzenedithiol, 1, 2-benzenedimethanethiol, benzene-ethanethiol, and 2-mercaptoethylether. Conductivity of a monolayer can also be enhanced by the addition of molecules that promote conductivity in the plane of the electrode. Conducting SAMs can be composed of, but are not limited to: 1) poly (ethynylphenyl) chains terminated with a sulfur; 2) an alkyl thiol terminated with a benzene ring; 3) an alkyl thiol terminated with a DNA base; 4) any sulfur terminated species that packs poorly into a monolayer; 5) all of the above plus

WU 02/01228

PCT/US91/20168

- 30 -

or minus alkyl thiol spacer molecules terminated with either ethylene glycol units or methyl groups to inhibit non specific adsorption. Thiols are described because of their affinity for gold in ready formation of a SAM. Other molecules can be substituted for thiols as known in the art from U.S. Patent No. 5,620,820, and other references.

5 When known ligands on signaling colloids interact with their cognate cell derived proteins, drug candidates can be added in solution and differential effects monitored. Cells can be recruited to an electrode coated with a conducting SAM that also presents molecules that are terminated with head groups that directly or indirectly bind to cells (e.g. methyl groups, poly K, positive charge, RGD sequences, Kringle motifs, integrins, 10 and peptide mimics of the same). Alternatively differential interactions can be quantified by having cell surface receptors that are interacting with their cognate ligands presented on a conducting SAM that are linked to the SAM. In this situation, the electronic or electrochemical signal is generated after a ligand binds to a constitutively expressed receptor. Under flow force the electronic or electrochemical signal should be 15 proportional to the number of cell surface receptors interacting with SAM-immobilized ligands. The rate of cell mobility as a function of flow rate indicates the density of receptors to cell adhesion molecules on the surface. Downstream of the interactive SAM is a charge reader (e.g. ammeter, charge counter) or an optical reader ( e.g. surface plasmon resonance detector, or fluorescence reader). In addition, these methods can also 20 be used to screen for drugs that inhibit a cell phenotype known to be characteristic to invasiveness or metastasis without a priori knowledge of the specific receptor-adhesion molecule interactions involved. Screening for drugs that mimic a physiologically relevant interaction can also be accomplished using this system whether by adding a drug candidate free in solution and looking for a loss of detection signal, or by adding a 25 known ligand free in solution with the drug candidate on the solid support and looking for the occurrence of a detection signal.

Cells are attracted to the sensing electrode due to the fact that they are negatively charged when a slight positive bias to the AC voltage ramp is applied. Adding additional negatively charged groups to the dendrimers or polymers to which the ligands are 30 attached further facilitates recruitment to the sensing surface. Those of ordinary skill in the art can readily fashion a plurality of signaling entities to a dendrimer or polymer. Alternatively, attaching the recognition ligands via metal binding tags facilitates their



WO 02/01224

PCT/US91/20168

- 31 -

binding (and consequently the binding of the associated cell) to alkyl thiol NTA. SAMs having metal containing compounds, such as ferrocene, on a gold coated magnetic bead allow the use of an electromagnetic field or a stationary magnet to recruit the complex to the sensing surface electrode. Also sensing electrodes that incorporate ligands, either  
5 directly or through a histidine tag, can be used to attract cells via specific interactions, such as with cell adhesion molecules or non specific interactions.

However, recruitment to the detection system can be performed also simply by using gravity if the complex sediments by gravity as a result of one of the binding partners being denser than the analysis solution. Mechanical mixing can be performed  
10 during the incubation stage to avoid premature sedimentation. Figs. 32A and 32B show ACV plots of an experiment demonstrating the use of gravity to recruit a signaling entity indicating a binding interaction to a surface, and a control. GST was bound to colloids via a metal binding tag/metal/chelate linkage (NTA-SAM). The colloids also presented ferrocene derivatives for electronic or electrochemical signaling. As a negative control,  
15 the colloids were presented in solution to a measuring electrode and the plot of Fig. 32A was derived. One set of colloids was exposed to polymeric beads (agarose) coated with glutathione. The colloids became fastened to the beads via glutathione/GST binding, and the beads settled onto the electrode by gravity. The ACV plot of Fig. 32B resulted, showing electroactive detection of ferrocene approximate the electrode.

20 In a variation that uses the electrode as a cell derived protein generator, a point on the electrode pad can be used to produce a voltage spike that lyses the cell. The contents of the cell are then incubated with signaling ligands and interactions are detected.

Additionally, cell binding molecules can be patterned in a given topology along the bottom of a flow channel using SAMs in order to line the channel with conducting  
25 molecules and enhance the detection abilities of the system. Thus, the SAM can present the binding moiety in a pattern that alternates cell binding capability with sensing capability (optical or electronic or electrochemical). As an example, stripes of methyl terminated alkyl thiols are alternated with conducting poly pyrrole groups in the SAM. The topology of the SAM can also be manipulated such that the cell lies in a furrow so  
30 that receptors along the sides of the cell can be assessed. Forming stripes of alternating functionality SAMs such as these can be carried out as described in U.S. Patent No. 5,512,131 and International Patent Publication No. WO 96/29629, both incorporated

WO 02/01228

PCT/US01/20368

- 32 -

herein by reference. These complexes can be electronically or electrochemically detected. One detection method is an electrochemical technique called alternating current voltammetry (ACV). This detection method can be supplemented by the use of additional analysis techniques such as higher order harmonic analysis. These complexes  
 5 may also be able to be detected by optical means such as SPR. In using the latter technique, large shifts in optical properties are caused by recruitment of the complexes to the sensing surface.

In one embodiment, one can detect and quantitate cell surface proteins as follows: Histidine-tagged ligands that recognize cell surface receptors are attached to colloids that  
 10 bear SAMs presenting both NTA (to capture His-tagged proteins) and ferrocene moieties (for electronic or electrochemical signaling). These biospecific, electronic or electrochemical signaling colloids are then incubated with cells presenting target receptors. Cells are then allowed to sediment, adhere, or be attracted onto a SAM-coated electrode and analyzed by ACV (Figure 3). A current peak, at the ferrocene  
 15 moiety's characteristic oxidation potential, will result if ligands immobilized on signaling colloids bound to their cognate receptors on the cell surface. Antibodies that recognize the cell surface receptor can be attached to NTA-ferrocene bearing colloids that have first been bound with His-tagged protein A or G. Alternatively, an antibody can be attached directly to a colloid via a metal binding tag/metal/chelate linkage, where the  
 20 metal binding tag is linked to the antibody. Techniques for linking a histidine tag to an antibody can be found in "Construction of the single-chain Fv from 196-14 antibody toward ovarian cancer-associated antigen CA125" Hashimoto, Y., Tanigawa, K., Nakashima, M., Sonoda, K., Ueda, T., Watanabe, T., and Imoto, T.: 1999, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol 22: (10) 1068-1072.; "Human antibodies with sub-  
 25 nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library", Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Barnshaw, J.C. et al. 1996, Nature Biotechnology Vol 14 (3) p. 267.; "Expression and purification of single chain anti-HBx antibody in E. coli" Zhou G, Liu KD, Sun H.C., Chen Y.H., Tang Z.Y., and Schroder C.H., 1997, vol. 123(11-12) pgs 609-13.

30 As one example of a technique of the invention, with reference to Figure 4, an example of a useful technique involving fastening of a colloid particle to a cell is described. The tumor marker, MUC-1, is aberrantly expressed on neoplastic cells. The

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 33 -

human tissue culture breast carcinoma cell line, MCF-7, available from the ATCC, over-expresses MUC-1. Antibody 50, DF3 or and DF3-p, available from the Dana-Farber Cancer Institute, is attached to electronic or electrochemical signaling colloids 52 (bearing NTA-SAMs 54) via a histidine-tagged protein G 56. Target cells 58 are  
 5 incubated with the antibody-bearing signaling colloids 52, then electrophoresed to an electrode 40 coated with a SAM containing molecular wires 58 and analyzed by ACV. The SAM on electrode 40 includes molecular wires 58 admixed within more conventional, tight-packing SAM-forming species. For simplicity of illustration in all figures, only molecular wires 58 are shown schematically. A current peak results if the  
 10 antibody-bearing signaling colloids are incubated with cells bearing MUC-1. Alternatively, the putative cognate ligand for MUC-1, I-CAM can be His-tagged and attached to signaling colloids that also bear NTA groups.

Another assay is shown in Figure 5. Drug libraries can be screened for their ability to disrupt specific interactions with cell surface proteins, such as the MUC-1/I-CAM interaction. I-CAM 64 is bound to signaling colloids 62 as described above, then  
 15 incubated with cells 70 presenting MUC-1 (66) and control cells. Drug candidates 68 are added to the solution within which the cells and colloids are suspended, then the cells adhere to the electrode and analyzed by ACV. A loss of signal indicates an interaction with a drug candidate. Figure 6 illustrates how this scheme can readily be multiplexed to  
 20 simultaneously screen thousands of drug candidates using arrays of disposable microwells 72 with interfascable arrays of microelectrodes 74. Each well contains an assay as shown in Figure 5 or another assay.

Referring now to Figure 7, an arrangement is shown in which for a gain of signal assay, or to screen for drugs to bind cell surface receptors 80 for which the cognate  
 25 ligand is not known, small molecule drug libraries can be synthesized on, or covalently attached to, colloids or particles 78 that also bear electronic or electrochemical signaling moieties 34. Drug candidates 76 attached to signaling particles can be incubated with cells 82 presenting the receptor 80 of interest, or control cells 84. A drug-target interaction in this assay will result in a gain of signal (Figure 7).

30 The cell surface receptor,  $\alpha V\beta 3$ , has been implicated in promoting angiogenesis through an interaction with a cell adhesion molecule vitronectin. Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) that present  $\alpha V\beta 3$  cell surface receptors are

WU 02/01228

PCT/US01/20168

- 34 -

commercially available from Clontech. To screen for drugs that inhibit the action of  $\alpha V\beta 3$ , His-tagged peptides that present RGD-containing sequences, derived from vitronectin, are attached to colloids that bear SAMs presenting both NTA groups and ferrocene moieties. The biospecific signaling colloids are then incubated with HUVEC cells and drug candidates. The HUVEC cells can be grown on the electrode. However, if the cells are in solution or suspension they can be electrophoresed or magnetically attracted to a sensing electrode and analyzed by ACV. A current peak occurs when biospecific colloids are incubated with HUVEC cells, rather than control cells. If a drug candidate interferes with the  $\alpha V\beta 3$ -RGD sequence interaction, a loss of signal results. Viability of this assay as a screen for angiogenesis inhibitors was shown by disrupting the  $\alpha V\beta 3$ -RGD interaction with the known angiogenesis inhibitor endostatin. The assay can be conducted electronically, as discussed, or visually by growing the cells in a standard plastic dish, conducting the assay, and viewing the cells under 40-fold magnification.

Alternatively, drug candidates can be synthesized on, or attached to, beads, colloids or supports that also present electronic or electrochemical signaling moieties. These "particles" or surfaces are incubated with target cells, attracted to a sensing electrode and analyzed by ACV. The attractive field is then reversed and peptides containing RGD sequences are titrated into the solutions. The cells are again electrophoresed to the sensing electrode and re-analyzed. A loss of signal indicates that the drug-cell interaction is specific for the  $\alpha V\beta 3$  receptor and the  $IC_{50}$  of the RGD peptide can be correlated to a binding affinity for the drug.

Alternatively, a 49 amino acid peptide, echistatin, that also binds to  $\alpha V\beta 3$ , can be His-tagged to replace the RGD-containing peptide in the above-described assay.

Metalloferrocenes are particularly useful as signaling entities for the following reasons. Various ferrocene derivatives can be selected to each oxidize at unique voltage between 100 mV to 300 mV. Each oxidation potential represents a unique label so that multiple cell surface targets can be simultaneously queried. If a biologically relevant interaction between a cell surface receptor and a colloid immobilized ligand occurs, the cell is decorated with electronic or electrochemical signaling particles and a current peak results. The magnitude of the current peak should be proportional to the number of cell surface receptors that were recognized by the signaling colloids.

WU 02/01228

CC:77US91/20368

- 35 -

Cell-surface molecules can be detected on cells in suspension or embedded in a tissue sample, as shown in Figure 8. Frozen tumor specimens 86 are cryo-sectioned and placed directly onto a flexible, semi-permeable membrane support 88 that has been derivatized with cell-binding groups 90 such as RGD-containing peptides or methyl-terminated groups. The specimen is then incubated with electronic or electrochemical signaling colloids 92 that also present ligands 94 for a cell surface receptor of interest. Unbound colloids are washed away after an incubation period. The support membrane is then placed in physical contact with a microelectrode array 96, having electrode dimensions comparable to cell size, and analyzed by ACV. Each sector of the tissue specimen is analyzed for protein content and expression level, then correlated with histopathology. This capability ensures the relevance of single cell analysis because it enables the researcher to identify protein patterns that are associated specifically with cancer cells and discard random aberrant protein expression. Cells in suspension can be similarly attached to the support membrane.

This technique can be used to identify cell-derived molecules, such as receptors or proteins, that are expressed differentially in healthy versus diseased tissue or cells. This differential expression can involve different levels of an expression in healthy versus diseased tissue or cells, and/or different patterns of expression on tissues or cells which can be readily identified. This technique facilitates diagnostic assays for determination of diseased states. For example, in connection with a patient suspected of having a particular disease, cells can be taken from the patient, specifically, cells that are associated with an indicator of the disease such as cells from a biopsy, blood sample, etc., and these cells can be analyzed versus healthy cells to determine expression levels or patterns indicative of disease. One can also use this system to screen for drugs that inhibit the upregulation of cell-derived proteins that are involved in various pathological conditions. Examples of two techniques for drug screening include: (1) administering a candidate drug to a patient suspected of or exhibiting symptoms of disease and monitoring a biological sample including cells of the patient as described above to determine efficacy of the drug in treatment of the disease; (2) taking a biological sample including cells from a patient suspected of having or having a disease and exposing the biological sample or components of the cells to candidate drugs, and monitoring expression level and/or pattern using the techniques described above. Once a binding

WU 02/01228

EC/T/US/01/2036H

- 36 -

partner (which can include a drug, antibody, or protein/peptide ligand for the cell derived protein) has been identified, the binding partner can be attached to a detection moiety to quantitate the expression level of the cell-derived protein in response to a disease state or a therapy. This can be any assay that tests for the indirect effects of drug candidates on the expression and translocation of cell-derived proteins both to the cell-surface and intracellular compartments.

The invention also provides the ability to visually investigate patterns of cell surface receptor expression on individual cell surfaces and/or on cells embedded in a tissue specimen. This can be indicative of the pattern of cell surface receptor expression which can be correlated to a disease state. These can also be used in diagnostics or drug screening methods. In a particular assay, colloid particles carrying ligands that bind to cell surface receptors are exposed to individual cells or embedded cells and the location of their binding with respect to individual cells can be determined visually, indicating the pattern of cell surface receptor expression. For example, MUC-1 is a cell surface receptor implicated in breast cancer. MUC-1 normally is expressed uniformly on surfaces of a variety of cell types. In transformed cells involved in a variety of cancers, the receptor is overexpressed and is concentrated at apical locations of the cell. This can be determined using the described technique. In drug screening, a culture of transformed cells can be provided and treated with drug candidates. The loss of the apical pattern expression is investigated. Visual identification, in this embodiment, can involve any technique described herein such as observation with the unaided human eye, microscopy, spectrophotometry, electron microscopy, fluorescence detection, etc.

In the technique involving electronic or electrochemical detection described above, the levels of expressed species can be compared between samples, including samples each involving an individual cell or other very small quantity, and patterns can be determined on larger samples including tissue samples. In connection with the visual detection embodiment described above, levels of expressed species can be determined as well as patterns of expressed species on both large samples and small samples including single-cell samples. Signaling entities useful in electronic or electrochemical detection include signaling entities described herein for electronic or electrochemical detection, including redox-active molecules such as ferrocenes. In connection with visual detection, any visual signaling entities described herein can be used including colloids,

WO 02/01228

PCT/US91/20368

- 37 -

alone or carrying auxiliary signaling entities such as fluorescent or other visibly-identifiable entities. Multiple signaling entities can be used (i.e., multiple signaling per binding event). In connection with both electronic or electrochemical or visual signaling, different signaling entities can be used in connection with different assays.

- 5 For example, a first ligand selected to target a first receptor or protein may be immobilized with respect to a first signaling entity while a second ligand, selected to target a second protein or receptor can be immobilized with respect to a second signaling entity. In electronic or electrochemical signaling the different signaling entities can include different redox potentials, the difference between which is distinguishable
- 10 electronically, and in connection with visual identification, different signaling entities can be different colors of emissive or absorptive entities. In such a case not only can expression level and pattern of proteins or receptors be determined but patterns can be differentiated in terms of location of expression of one receptor or protein versus another.

- The biospecific colloids, described above, can also be used to facilitate *in vivo*
- 15 imaging. The colloids used are gold, which is relatively inert. Gold colloids that have been derivatized to present an antibody or other ligand for a tumor marker can be taken internally or injected. A tumor mass presenting the cognate tumor marker will become covered with colloids, acting as a concentration device. The tumor can then be detected by imaging techniques, such as X-Ray and X-Ray computer tomography (CT), since the
- 20 effective result can be a tumor mass enshrouded in metal. Individual colloids in solution would be invisible to detection. Tumors that have been so labeled with biospecific colloids can also be detected by MRI (magnetic resonance imaging). Imaging may be enhanced by incorporating paramagnetic metals and other contrast agents, such as Fe, Gd, or Cr. Contrast agents can be attached to the colloids by incorporating metal
- 25 chelating thiols into the SAMs that are formed on the colloids. Alternatively, SAMs that only present a cognate ligand for the target protein expressed on the tumor, can be formed on particles composed of the contrast agent material. Colloids having an iron or magnetite core can be gold-coated then derivatized with biospecific SAMs.
- Alternatively, liposome-like particles can be formed from lipid chains terminated in
- 30 chelating groups such that the metal contrast agents form the "core" and the biospecific ligands are exposed to solvent. Alternatively, the colloids can bear, in addition to the biospecific ligand, moieties that have a specific spectroscopic signature, which can be

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 38 -

detected by energy absorption or scattering techniques, including Raman Spectroscopy. The imaging apparatus can be contained outside of the body or introduced into the body on scopes or optical fibers. Alternatively, colloids bearing moieties that transmit radio frequencies can generate a detectable signal if concentrated onto a tumor mass. The signal from individual colloids should be negligible or undetectable compared with the signal generated from a concentration of colloids bound to a tumor mass.

With reference to Figure 9, to determine whether two proteins interact with each other, one will bind the first protein 104 to a colloid 106 presenting both NTA 54 and ferrocene ligands 34 and bind the second protein 100 to a SAM-coated magnetic bead 102 that presents only the NTA ligand 54. The two particle types are mixed together then magnetically recruited to a sensing electrode 40 under which is a magnet 108. An electronic or electrochemical signal will only be generated if the magnetic bead were connected to the signaling colloid through the interaction of the two protein species. Non-histidine-tagged proteins can also be attached to signaling or magnetic (recruitable) particles by forming SAMs on them that incorporate carboxy-terminated thiols along with thiols terminated with an exposed group that is charged and that is not involved with the coupling chemistry (such as NTA thiols). Standard EDC/NHS coupling chemistry can then be used to attach any molecule that presents a primary amine. Because the electronic or electrochemical labeling step has been separated from the protein preparation step, the system can be efficiently multiplexed using universal electronic or electrochemical signaling colloids and magnetic particles. This facilitates the construction of protein interaction databases to help researchers decipher the molecular profiles of cancers.

Interacting protein partners can be incubated with small molecule drug libraries and drug leads identified by detecting a loss of signal. Alternatively, small molecule drug libraries can be purchased on magnetic beads to directly screen for drug candidates that bind to a known, target protein.

The basic technology described herein can also be used to screen for drugs to modulate enzyme activity. Certain enzymes have been identified as being critical to the progression diseases. In some cases a molecule must be cleaved at a specific site for it to become active and one would like to screen for drugs that inhibit the activity of the



WU 02/0122H

PC77USM/2036H

- 39 -

enzyme that does this. The technology described herein can be used as described below for this purpose:

Useful in carrying out this technique is the following: Edelstein and Distefano have reported that farnesyl pyrophosphate groups modified with photoactivatable cross-linking moieties can be added to peptide motifs derived from RAS by yeast FPT (Edelstein R. and Distefano M. (1997). Photoaffinity labeling of yeast farnesyl protein transferase and enzymatic synthesis of a RAS protein incorporating a photoactive isoprenoid. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 235, 377-382). Their objective was to use this assay to show that farnesyl derivatives were recognized by FPT, by cross-linking the two. This finding is consistent with the idea that farnesyl or geranyl moieties can be modified with biotin at the end distal from the pyrophosphates without interfering with enzyme activity or specificity.

With reference to Figure 10, an enzyme cleavage site (ECS) 110 can be attached at one end 112 to a molecule 122 for which there is a known binding partner (BP1). At the other end 114, it can be attached to a molecule 116 that can incorporate into a SAM (HS-R-X), where S is sulfur, R is an molecular species that can incorporate into a SAM, and X is a linker. The resultant molecule can be incorporated into SAMs on colloids 116 along with groups 118 that can deliver an electronic signal (HS-R-XM), where M is a redox-active metal or transition metal (or other group capable of transducing an electronic or electrochemical signal when brought close to an electrode). Magnetic beads or particles 120 can be derivatized to present a molecule 124 (e.g., streptavidin) (BP2) that binds to BP1 122 either directly or indirectly through a simultaneous binding to a mutual target molecule (BP3).

For example, electronic or electrochemical signaling colloids 116 can be derivatized with thiols bearing enzyme cleavage sites (ECS) and terminated with biotin. Magnetic beads can be derivatized with streptavidin. Magnetic beads and signaling colloids can be incubated with the enzyme of interest and drug candidates. If a drug candidate that can moderate, or inhibit the action of the enzyme, then the site (of e.g., a protein or peptide) would not be cleaved, and the signaling colloid would be attached to the magnetic bead through the biotin/streptavidin interaction. When the complexes are magnetically attracted to a sensing electrode, a current peak would result, making the assay a gain of signal detection assay. That is, a protein can be adapted for linkage both

WO 02/01220

PCT/US98/20368

- 40 -

to colloid 116 and bead 120 via a SAM-forming species at one end and a binding partner 122 linkable to an immobilized binding partner 124 on bead 120, and cleavage, or moderation thereof, monitored. The protein can be linked to the colloid and bead in a variety of ways including that described or, in addition, the colloid can present a chelate  
5 coordinating a metal, the protein can be provided with a metal binding tag. The invention is even more generalized, in that any entity adapted for linkage both to the colloid particle 116 and any non-colloidal structure, such as bead 120, can be presented to the colloid and the non-colloidal structure and allowed to link thereto, in the presence both of an enzyme having the ability to cleave the entity and a candidate drug for moderation  
10 of activity of the enzyme. The non-colloidal structure can be a bead as illustrated, or an electrode itself.

BP1 can be the same as BP2 and/or BP3. For example, the thiol that bears the ECS and BP1 (biotin) can bind to free streptavidin (BP3) then to biotin (BP2) on the magnetic beads. Alternatively, one may seek to inhibit or accelerate an enzyme that  
15 adds a molecular group to a target molecule, i.e., one can expose a colloid particle and a non-colloidal structure to a substrate for an enzyme adapted for linkage to the non-colloidal structure, a molecular species linkable to the substrate via enzyme activity adapted for linkage to the particle and an enzyme for the substrate. This can be carried out further in the presence of a candidate drug for moderation of the enzyme, and  
20 the non-colloidal structure can be a magnetic bead with the colloid particle carrying an immobilized electroactive entity. Alternatively, the non-colloidal structure can be an electrode surface.

Specifically, with reference to Figure 11, in such a case, electronic or electrochemical signaling colloids 126 are derivatized with the molecule 128 via  
25 chelate/metal/metal binding tag linkage, to which the group is to be added. The piece to be added, the addition molecule 130, is terminated with a first binding partner (BP1) 132 (can be biotin). The magnetic bead 12 presents a binding partner of BP1, (BP2) 134 (can be streptavidin). Colloids, magnetic beads, addition molecules, the enzyme of interest and drug candidates are incubated then attracted to an electrode for analysis. A loss of  
30 signal, compared to controls, indicates that the drug candidate inhibited the enzyme's activity while a gain of signal indicates a drug enhanced the enzyme's activity.

WO 02/01228

PCT/US90/20164

- 41 -

A wide variety of SAMs can be used in accordance with the invention, on a wide variety of surfaces, to present desired species such as binding partners, signaling entities, and the like at a surface of an article such as an electrode, colloid particle, or the like.

Those of ordinary skill in the art can select from among a wide variety of surfaces, functional groups, spacer moieties, etc. An exemplary description can be found in U.S. Patent No. 5,620,850. This U.S. Patent also describes a variety of metal binding tags that can be used, including nitrilotriacetic acid, 2,2'-bis(salicylideneamino)-6,6'-dimethyldiphenyl, and 1,8-bis(2-pyridyl)-3,6-dithiacetane, or the like.

A variety of non-colloidal structures comprising beads are described above. The beads can comprise polymeric material, agarose, tencel, and/or magnetic material. Polystyrene beads are quite useful. The function and advantage of these and other embodiments of the present invention will be more fully understood from the examples below. The following examples are intended to illustrate the benefits of the present invention, but do not exemplify the full scope of the invention.

The following examples and experiments illustrate particular embodiments of the present invention and are not to be construed as limiting the invention to any particular embodiment.

In some of the embodiments described below, the examples involve SAM formation, collagen coating, cell growth, colloid formation, and Alternating Current Voltammetry (ACV). For SAM formation, glass microscope slides were sputtered with a layer of Ti followed by a layer of Au. Each electrode was incubated at RT for 0.5 hours with 300  $\mu$ L of a DMF solution that contained 10% methyl-terminated thiol (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>), 40% tri-ethylene glycol-terminated thiol, HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, (formula) and 50% MF-1. 2 ml of 400  $\mu$ M tri-ethylene glycol-terminated thiol were then added to a scintillation vial containing the chip and the vial was heat cycled in a water bath as follows: 2 minutes @ 55°C; 2 minutes @ 37°C; 1 minute @ 55°C; 2 minutes @ 37°C then RT for 10 min. Electrodes were then dipped in EtOH, then sterile PBS to rinse. They were then placed under the LTV germicidal lights in a biosafety cabinet for 1 hour to ensure sterility.

For collagen coating, a 200  $\mu$ L droplet of 0.005 mg/ml collagen in PBS was added to each electrode and incubated at 4°C for 2 hours.

WO 02/01228

PCT/US99/20368

- 42 -

For cell growth, the electrodes were placed in a cell growth flask and a solution of growth media and human endothelial cells (HUVECs), presenting a particular cell surface receptor,  $\alpha V\beta 3$ , was added. The electrodes and cell containing solution were incubated at 37 °C in a CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours. Visual inspection with 100X magnification showed that the cells had adhered to the electrodes and showed web-like spreading which is a growth phenotype.

For colloid preparation, 1.5 ml of commercially available gold colloid (Auro Dye) were pelleted by centrifugation in a microfuge on high for 10 minutes. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ L of the storage buffer (sodium citrate and tween-20). 100  $\mu$ L of a dimethyl formamide (DMF) solution containing 90 mM nitrilo tri-acetic acid (NTA)-thiol, 90  $\mu$ M ferrocene-thiol, and 500  $\mu$ M carboxy-terminated thiol. Following a 3-hour incubation in the thiol solution, the colloids were pelleted and the supernatant discarded. They were then incubated in 100  $\mu$ L of 400  $\mu$ M tri-ethylene glycol-terminated thiol in DMF for 2 minutes at 55 °C, 2 minutes at 37 °C, 1 minute at 55 °C, 2 minutes at 37 °C, then room temperature for 10 minutes. The colloids were then pelleted and 100  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS) were added. The colloids were then diluted 1:1 with 180  $\mu$ M NiSO<sub>4</sub> in the colloid storage buffer. 100  $\mu$ L of a His-tagged peptide at 100  $\mu$ M in PBS were added to 100  $\mu$ L of NTA-Ni(II) presenting colloids and incubated for 0.5 hours. To get rid of free, unattached peptide, the colloids were then pelleted and the supernatant discarded. The colloid pellet was then resuspended in 100  $\mu$ L PBS. Colloids were bound with either: a) a peptide designed to bind to the  $\alpha V\beta 3$  receptor, HHHHHH(S<sub>2</sub>G<sub>1</sub>)<sub>2</sub>GRGDSGRGDS; or b) an irrelevant peptide, HHHHHH-Glutathione S-Transferase (GST). Peptides containing an RGD motif have been shown to bind to the  $\alpha V\beta 3$  receptor on endothelial cells. It is thought that RGD motifs in vitronectin (the natural ligand for  $\alpha V\beta 3$ ) are responsible for the interaction.

ACV Analysis was performed using a CH Instruments electrochemical analyzer. A three-electrode system was used. A silver vs. silver chloride reference electrode was used with a platinum auxiliary electrode. The derivatized gold-coated chip was used as the working electrode. A 25 mV overpotential was applied to the electrode at a frequency of 10 Hz.

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 43 -

Example 1

This example describes an assay to screen for inhibitors of farnesyl protein transferase (FPT) and geranylgeranyl protein transferase (GGPT).

We have designed an assay that can be readily multiplexed that: 1) incorporates the wild-type target protein and mutants into the initial screening process; 2) directly detects and quantitates the addition of farnesyl/geranyl groups and analogs thereof to the target protein by the enzyme of interest; and 3) can detect differential effects of drug candidates on enzyme activity.

Our strategy is to: 1) attach histidine-tagged RAS proteins (or peptide motifs or fragments derived from the various mutants) to colloids bearing SAMs that present both NTA/Ni(II) groups (to capture histidine-tagged proteins) and transition metals such as ferrocene for electronic or electrochemical signaling; 2) modify farnesyl pyrophosphate derivatives with biotin (Figure 13); 3) add enzyme; 4) add candidate inhibitor; 5) add magnetic beads bearing streptavidin; 6) magnetically attract to a sensing electrode and electronically analyze. The enzyme FPT should add the biotinylated farnesyl (or geranyl) moieties to the RAS immobilized on the signaling colloid. Magnetic beads bearing streptavidin will bind to the biotin and the complex will be both recruitable and detectable. Assays will be performed in parallel in microwells interfaced with a microelectrode array, varying the RAS variant immobilized on the signaling colloid, and the drug candidate (Figures 14 and 15). The entire microelectrode array will be electronically analyzed to determine the differential effects of drug candidates on enzyme activity for particular target proteins. If a drug candidate interferes with the enzyme adding a farnesyl group to the target mutant protein, a diminution of the electronic or electrochemical signal will result.

This strategy can be used to monitor an enzyme's activity or screen for drugs that modulate its activity. Non-histidine-tagged proteins can also be attached to signaling colloids by standard coupling chemistry. Farnesyl derivatives can alternatively be modified with a recognition group other than biotin, that is a binding partner of a group immobilized on the magnetic beads.

Edelstein and Distefano have reported that farnesyl pyrophosphate groups modified with photoactivatable cross-linking moieties can be added to peptide motifs derived from RAS by yeast FPT (Edelstein R. and Distefano M. (1997). Photoaffinity

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 44 -

labeling of yeast farnesyl protein transferase and enzymatic synthesis of a RAS protein incorporating a photoactive isoprenoid. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 235, 377-382). Their objective was to use this assay to show that farnesyl derivatives were recognized by FPL, by cross-linking the two. This finding is consistent with the idea that farnesyl or geranyl moieties can be modified with biotin at the end distal from the pyrophosphates without interfering with enzyme activity or specificity.

#### Example 2

In this example, cells were attached to gold-coated electrodes derivatized with SAMs. The cells, which were still attached to the electrode, were then incubated with a solution containing gold colloids which had been derivatized to present both a ligand specific for a receptor on the cell surface and a redox-active metal capable of delivering an electronic or electrochemical signal to the electrode. After some incubation period, the electrodes were scanned by alternating current voltammetry (ACV). A positive interaction between the colloid-bound ligand and the cell surface receptor will bring the redox-active metal, also on the colloid, close enough to the electrode to transduce an electronic or electrochemical signal.

More specifically, electrodes were derivatized with SAMs to present 10% methyl head groups in a background of 50% Bis(ethynylphenyl thiol) (i.e.  $C_{18}H_{18}S$ ) to facilitate electron flow to the electrode. 40% triethylene glycol-terminated thiols  $(HS(CH_2)_4)_3(CH_2CH_2)_3OH$  were included to help monolayer packing. It had previously been shown that cell growth can be supported on HSC15-methyl-terminated SAMs that were coated with collagen. Both the  $HSCH_2C_{15}CH_3$  and the collagen are insulating molecules and can inhibit electron flow to the electrode. For this reason, in this example, the saturated carbon chain-collagen coverage was reduced to produce islands of growing cells adjacent to the more conducting molecular wires. Human endothelial cells (HUVECs), that present a cell surface receptor  $\alpha V\beta 3$ , which is important for angiogenesis, were grown on the electrodes. SAM-coated gold colloids bearing a ligand for the receptors and ferrocene moieties for electronic or electrochemical signaling were briefly incubated with the cell-presenting electrodes, then analyzed by ACV.

For ACV analysis, a 1ml capacity silicone gasket was clamped onto the cell-presenting electrode. 100ul of NTA-Ni colloids that had been pre-bound with a His-tagged RGD motif peptide and 100ul PBS were added to the gasket for incubation with

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 45 -

the cell-presenting electrode. After 15 minutes, the first ACV scan was taken. Two successive scans were taken at 15 minute intervals. Current output was plotted against voltage. The first scan produced a broad current bulge characteristic of PBS buffer. The second and third scans generated a distinctive current peaks 0.5uAmps and 1.6uAmps respectively, at a characteristic ferrocene potential (at 780 mVolts), see Figure 16. The negative control, in which an identical electrode presenting the same cells was incubated with 100uL of NTA-Ni(II) colloids that were pre-bound with His-tagged GST, produced a first scan that was similar to the electrode incubated with RGD-presenting colloids. However, the broad bulge had decayed by the second and third scans which were identical (Figure 17). In sharp contrast to the 1.6 uAmp peak for the positive, no well-defined peak resulted for the negative control.

#### Example 3: Cell growth on conducting surfaces

This example describes the electronic detection of cells grown on "conducting" surfaces that were not coated with collagen. Cells were grown on gold electrodes that were modified with sulfur-containing molecules, in some cases assembled into monolayers, but not coated with collagen. Electrode modification was performed as described in the electrode preparation section of Example 2, with the exception that electrodes incubated with 100% candidate molecule were not heat cycled in tri-ethylene glycol-terminated thiol. Several electrodes were assembled in the same cell growth flask and media containing HUVEC cells was added. The electrodes and cells were incubated in a CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours. Surfaces were visually analyzed using 100X magnification. Table 1 lists surface modification and subsequent cell adhesion/growth characteristics. Surfaces showed low non-specific binding. Once cells bound, however, cell growth was good. Cells can easily be immobilized on a SAM by presenting a metal chelate coordinating a metal via the SAM, linking a protein to the SAM via a metal binding tag on the protein, the protein attracting the cell. Photographs were taken to document results (not shown). Cells were incubated with colloids (as described above) that displayed ferrocene moieties and a peptide, HHHHHH(S<sub>4</sub>G<sub>1</sub>)<sub>3</sub>GRGDSGRGDS, that was specific for the  $\alpha$ V $\beta$ 3 receptor on the cell surface; or as a negative control, an irrelevant peptide, HHHHHH-Glutathione S-Transferase (GST). Figure 18 shows that cells grown on a 100% ethynylphenyl thiol (MF1) SAM-coated electrode produced current peaks only if incubated with colloids bearing the ligand specific for the  $\alpha$ V $\beta$ 3

WO 02/01228

PCT/US98/20168

- 46 -

receptor (Figure 18, solid line) and not when incubated with colloids derivatized with an irrelevant peptide GST (Figure 18, dotted line).

Figure 19 shows electrochemical scans of electrodes derivatized with 25% 2-mercaptoethyl ether in a background of insulating tri-ethylene glycol terminated thiols.

- 5 Cells derivatized with colloids presenting the RGD sequence peptide produced a small peak (Figure 19, solid line), while the cells incubated with colloids presenting the GST peptide did not (Figure 19, dotted line).



WO 02/1228

PCT/US98/20368

- 47 -

TABLE I

SURFACE MODIFICATION	CELL ADHESION within 1/2 hour	CELL GROWTH within 24 hours
100% methyl-terminated SAM	NO	NO
100% methyl-terminated SAM, incubated with irrelevant proteins	NO	NO
100% methyl-terminated SAM, incubated with collagen	NO	YES
10% methyl terminated thiol in a background of molecular wire thiols, with or without tri-ethylene glycol-terminated thiols then coated with collagen	NO	YES
100% tri-ethylene glycol-terminated SAM	NO	YES
100% HS-2-unit molecular wire	NO	YES
100% 2-mercaptobenzothiazole	NO	YES
100% 1,2-benzenedimethanethiol	NO	YES
100% Benzene ethane thiol	NO	YES
100% 2-mercaptoethyl ether	NO	YES
NTA-Ni(II) in a background of tri-ethylene glycol-terminated thiol with or without ferrocene thiols mixed in- unbound by a His-tagged peptide	NO	YES
NTA-Ni(II) in a background of tri-ethylene glycol-terminated thiol with or without ferrocene thiols mixed in - bound by an irrelevant His-tagged peptide	NO	NO
NTA-Ni(II) in a background of tri-ethylene glycol-terminated thiol, with or without ferrocene thiols mixed in - bound by a cell specific His-tagged peptide	YES	YES

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 48 -

Example 4: Decoration of polymeric bead with colloid particles via Glutathione-S-Transferase / Glutathione binding

See Figures 20 and 21. The example below demonstrates how colloids presenting a target protein agglomerate onto a non-colloidal particle that presents a small molecule, drug candidate, peptide, protein, nucleic acid, or combinations thereof that is or are a binding partner of the target protein. Many combinatorial drug libraries are synthesized on non-colloidal particles or beads and can be mixed with colloidal particles that display a medically relevant target species. One can readily identify the bead that displays the drug that is a binding partner for the target species, as the colloidal particles agglomerate onto that bead and color it red.

A target protein, Glutathione-S-Transferase (GST) was histidine-tagged and immobilized on SAM-coated colloids that presented NTA-Ni (histamine tags bind NTA-Ni). 30ul of colloids presenting 40uM NTA-Ni on the surface were added to 65ul of 21.5uM GST, to give a final concentration of 14uM GST in solution. Glutathione, a small molecule that binds GST, is commercially available bound to agarose beads through Sigma-Aldrich. Glutathione-coated beads were incubated with the solution of GST-bound colloids. Within minutes, the GST bound to the glutathione heads, bringing the colored colloids out of solution, and decorating the beads red (Figure 20). Beads displaying a small molecule that does not bind to GST remained colorless when incubated with the GST-bound colloids (Figure 21). A second negative control, in which glutathione-coated beads were incubated with 30ul NTA-Ni colloids in the absence of GST showed that NTA-Ni-colloids do not bind nonspecifically to the bead surfaces or to the glutathione.

Example 5: Demonstration of Control of SAM permeability to electrons

This example demonstrates the ability to form a SAM including enhanced electronic communication. The SAM is formed on a surface that includes a mixture of a first, tight-packing species and a second species of different molecular structure that enhances the permeability of the SAM to electronic communication. A defect, or opening, is formed in the SAM allowing fluid to which the surface is exposed to communicate electrically with the surface. Specifically, certain small sulfur containing compounds having disruptive structures relative to the SAM as a whole were stably

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 49 -

incorporated into a SAM, and greater permeability to electrons was demonstrated. This example demonstrates that a surface can be made electrically relatively conductive, and then support cell growth.

A water-soluble ferrocene derivative was dissolved in the electrolyte solution:

5 100mM solution of ferrocenedicarboxylic acid in 500uM NaClO<sub>4</sub>. The working electrode was a gold-coated electrode derivatized with a SAM comprised of varying amounts of 2-unit molecular wire (MFI). The height of the peak at a characteristic ferrocene potential was plotted as a function of molecular wire density. As a negative control, a gold-coated electrode was derivatized with an insulating SAM comprised of  
10 100% tri-ethylene glycol terminated thiol. Figure 22 shows that the "conductivity" of the SAM or the ability of electrons in solution to penetrate the SAM is a function of the density of 2-unit molecular wire integrated into the SAM. This system was used to test the conductivity of electrodes modified with a panel of sulfur-containing compounds. The compounds were dissolved in DMF at 50% candidate compound and 50% tri-  
15 ethylene glycol terminated thiol. Electrodes were derivatized as described in Example 1. Table 2 lists the candidate compounds and the height of the current peak produced when analyzed by ACV. Figure 22 shows two experimental results of tests of conductivity of a monolayer as a function of monolayer disruption by poly (ethynylphenyl thiol).

SAMs were formed on gold chips from 500 micromolar triethylene glycol-  
20 terminated thiol and 500 micromolar of either mercaptobenzothiazole or 2-mercaptanethyl ether in DMF. The chips were clamped between a flat substrate and a 1 ml capacity silicon gasket. A solution of ferrocene dicarboxylic acid was dissolved in 500 micromolar NaClO<sub>4</sub> and placed in the silicon gasket with a Ag/AgCl reference electrode and a Pt auxiliary electrode. The gold chip was connected as the working electrode. The  
25 system was analyzed by ACV. The magnitude of the current peaks, resulting from the ferrocene in solution communicating with the electrode, was an indicator of the ability of the trial compounds to make the SAM more permeable to electron flow by creating defects within the SAM. Figure 23 is an overlay of a SAM comprised solely of the insulating species tri-ethylene glycol-terminated (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-SH (+++ line) and the  
30 reportedly more conducting poly-ethynylphenyl thiol species (MFI) (solid line). The conducting poly-ethynylphenyl thiol species is expected to be more conductive, as an identical molecule but with two additional repeat units is reported to be conductive

WU 02/0122H

PCT/US91/2016H

- 50 -

(Science 1997 Burm et al). As predicted, the alkyl thiol SAM does not produce a current peak in a ferrocene dicarboxylic acid solution, but a SAM comprised of 50% poly-ethynylphenyl thiol does. Figure 24 shows the plots of Figure 23 (dots are TEG-terminated thiol, stars are poly-ethynylphenyl thiol), against the more conducting SAMs including 2-mercaptoethyl ether (solid line) and mercaptobenzothiazole (++++ line), showing that the current peak from the poly-ethynylphenyl SAM is orders of magnitude smaller than those generated by SAMs comprised of 50% 2-mercaptoethyl ether or a SAM comprised of 50% mercaptobenzothiazole, which is consistent with the idea that SAMs can be made permeable to electron flow by either incorporating conductive species into the SAM or by inserting "defect" or "opener" molecules into the SAM.

TABLE 2. Electrodes were derivatized with the following compounds in a background of tri-ethylene glycol-terminated thiol. Electrode preparation was performed as described in Example 1. The "conductivity" or permeability of the surfaces was assayed by measuring the magnitude of the current peak produced by the oxidation/reduction of ferrocene dicarboxylic acid in the electrolyte solution (0.5 M NaClO<sub>4</sub>). The ability of each compound to resist non-specific binding was assayed by dipping each surface in BSA (bovine serum albumin) prior to measurement. Non-specifically adsorbed proteins would occlude the conduction of electrons through the monolayer to the electrode.

COMPOUND	50% coverage Peak height in :Amps	25% coverage Peak height in :Amps	25% coverage Peak height in :Amps after blocking with BSA	Supports cell growth on 100% coverage or fractions thereof
HS(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> Tri- ethylene glycol 100% coverage - negative control	0	ND	ND	YES
HS-2-unit molecular wire Positive control	0.415	ND	0.15 at 50% coverage	YES
2- mercaptopyridine	14.70	ND	ND	ND
2- mercaptobenzothia- zole	44.00	0.28	0.29	YES
Dithiothreitol	41.00	ND	ND	ND
1,2-benzenedithiol	40.00	ND	ND	ND
1,2- benzenedimethanethiol	34.90	28.00	4.02	YES
Benzenecethanethio	31.50	0.51	0.08	YES

WU 02/01220

PCT/US91/20168

- 51 -

1				
2-mercaptoethyl ether	39.30	57.70	19.0	YES

Example 6: Detection of Protein-protein interactions

This example demonstrates the utility of a colloid particle having an immobilized signaling entity and an immobilized protein. (See Figure 27.)

- 5 Histidine-tagged Glutathione-S-Transferase (GST-His) was attached to NTA-SAM-coated colloids, displaying 40 $\mu$ M NTA-Ni and 100 $\mu$ M ferrocene-thiol. Commercially available magnetic beads presenting protein A were coated at 1/10 binding capacity with anti-GST antibody, added at a 1:5 ratio to the GST-colloids, and measured on a 50% MF-1 SAM-coated electrode, which was placed on top of a magnet.
- 10 The magnet pulled the magnetic beads onto the electrode surface to form a thick, visible precipitate. The GST-colloids were brought down to the electrode surface by the interaction with the GST-antibody on the magnetic beads to give a current peak at approximately 280mV. Two negative controls were run, one where GST was not attached to the colloid surface, and another where the GST antibody was not attached to the magnetic beads. Neither negative control gave a current peak. Figure 25 plots the
- 15 results of this demonstration. Solid line represents interaction between GST-His-presenting colloids and anti-GST/Ab on magnetic beads. Open circles represent magnetic beads presenting the antibody incubated with colloids that did not present GST. Closed circles represent beads not presenting the antibody, incubated with colloids that
- 20 presented GST.

Example 7: Cell Detection

- This example demonstrates both the advantage of forming a SAM on a surface that includes a mixture including a molecular species that enhances electronic communication across the SAM by forming a defect in the SAM allowing fluid to which
- 25 the surface is exposed to communicate electrically with the surface, and the utility of attachment of a colloid carrying immobilized signaling entity to a protein. The protein is in turn immobilized at a cell attached to the surface of an electrode presenting the SAM. The defect in this case is caused by bulk of the a SAM-incorporated molecule including phenyl rings.

WO 02/01228

PCT/US01/20368

- 52 -

HUVEC cells were suspended in media and placed in a flask over a SAM coated on a gold surface. The SAM included 50% straight chain thiols, and 50% of the 2-unit poly(ethynylphenyl) thiol (MF1). 5ul of an 8.4mM RGD-His peptide solution was added to the media, and cells were incubated at 37C overnight to adhere to the electrode surfaces. After approximately 16 hours, 100ul of SAM-coated colloids, displaying NTA for capturing the RGD-His peptide and ferrocene for signaling, were added to the cells and incubated for 20 min at room temperature. The electrodes were then rinsed in buffer to wash off any unbound colloids and measured. Current peaks were recorded at 220-250mV. Negative controls were cells incubated with His-GST, an irrelevant protein that should not bind to cells. Colloids were added to negative controls, electrodes were rinsed in buffer, and measurements were taken. No peaks were observed for negative controls. Figure 26 shows a peak (solid line) generated when colloid presenting ferrocene signaling entity and his-tagged ligand to a cell surface receptor is brought to an electrode surface by cell/surface interaction. Diamond represent negative control where colloids displayed an irrelevant protein selected not to bind to the cell surface receptor.

Example 8: Detecting Ligand-Receptor Interactions for Unmodified Ligands

This example demonstrates the ability to determine protein/ligand interaction in the absence of SPR without labeling either the protein or the ligand. Specifically, exposing a ligand to a protein suspected of interacting with the ligand where the ligand is in fixed proximal relationship with an electroactive entity, namely ferrocene, whose electroactive signal is dependant upon proximity to the protein, by forming a SAM including the ligand and ferrocene on the surface of an electrode.

We have found that the characteristic oxidation potential of a ferrocene derivative can be shifted based on the chemical nature of the ferrocene derivative's local environment. As proteins are brought into close proximity to the ferrocene derivative, a second current peak at an altered potential appears. The magnitude of this altered peak is proportional to the density of protein in the system.

A panel of gold-coated electrodes were derivatized with heterologous SAMs that comprised a constant density of conductive molecular wire thiol and variable density of methyl-terminated thiol in a background of tri-ethylene glycol-terminated thiol. It had previously been shown that: 1) tri-ethylene glycol-terminated SAMs resist the non-specific adsorption of proteins; and 2) methyl-terminated SAMs bind proteins,

WU 02/0122H

PCT/US01/2016H

- 53 -

specifically collagen. We therefore assumed that if the electrodes are incubated with collagen in solution, the density of collagen, that non-specifically adsorbs, will increase as the density of methyl-terminated thiol increased. SAMs that contained 2%, 4%, 10% and 15% methyl-terminated thiol were formed on gold-coated electrodes. Half the electrodes were incubated for 2 hours at 4°C with 0.005 mg/ml collagen in PBS while the other half was incubated with PBS alone. The electrodes were analyzed by alternating current voltammetry (ACV) with a water soluble ferrocene derivative, ferrocenedicarboxylic acid, dissolved in the electrolyte solution (0.5 M NaClO<sub>4</sub>). The alternating oxidation/reduction of the ferrocene at a characteristic potential produces a current peak. The magnitude of this current peak and potential at which it occurred were recorded. At low density methyl-terminated thiol, a current peak was produced at about 450 mV; its magnitude and position appeared to be unaffected by the presence of the protein, collagen. At higher density methyl-terminated thiol, 10% and over, a second current peak is produced at about 300 mV, but only in the presence of the protein collagen. Figure 28 shows high-density methyl terminated thiol electrodes in the presence of ferrocene dicarboxylic acid. Solid line represents electrodes with collagen bound to the methyl thiols. The hydrophobic environment caused by the collagen on the surface of the electrode causes the oxidation potential of the ferrocene to shift, and two peaks are seen. Solid circles represents high-density methyl terminated thiol electrodes that are not bound to collagen and thus do not affect the oxidation of the ferrocene.

This strategy can be used to detect the presence of unmodified proteins, peptides, cells as follows: a mixed SAM is formed from ferrocene dicarboxylic acid attached to an alkyl thiol, a thiol designed to make the SAM permeable to electron flow and a thiol terminated in a binding partner for a target species (the binding partner can also be histidine-tagged and attached to the electrode by binding to an NTA-Ni moiety in the SAM). If the target species is present in the sample solution, then it binds to its binding partner that is presented on the SAM. The presence of the protein near the SAM surface changes the chemical environment around the ferrocene dicarboxylic acid and causes its oxidation potential to shift to a lower potential. A shift in the characteristic oxidation potential of the immobilized redox-active metal indicates the presence of the target species.

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 54 -

When these experiments were performed with ferrocene derivatives that did not have polar substituents on the ring, no effect was observed. Therefore, for this strategy to work, it is essential that the immobilized redox-active metal is in a polar environment and that the immobilized binding partner (connected to the SAM via a thiol) is as small as possible.

#### Example 9: ELISA

A technique familiar to those skilled in molecular or cellular biology is Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) (*Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, Immunology 11.2*, 1996, copyright from John Wiley and Sons Inc. 1994-1998). A major problem with ELISAs is sensitivity. Enzyme signaling occurs at a 1:1 ratio; one antibody-coupled enzyme signals the presence of one antigen. Therefore, microgram quantities of antigen are necessary for an effective ELISA, which is not plausible in all cases. This renders ELISAs ineffective for detection of antigens on a cell surface that are expressed or presented at low levels. Another problem with ELISAs is that at low antigen concentrations, the assay is very time-consuming. The amount of enzyme hydrolysis is directly proportional to the time of hydrolysis. Normally when one performs an ELISA, a target species is directly or indirectly attached to a plastic substrate. The presence of the immobilized species is then detected by binding to it a "secondary" antibody that also has a signaling capability; the secondary antibody is usually conjugated to an enzyme, typically horseradish peroxidase (HRPO), alkaline phosphatase (AP), or a fluorescent tag which is capable of performing a reaction on an added substrate that results in a color change (detected by a spectrophotometer), or a fluorescence labeling tag that can be detected by a fluorimeter (see, for e.g., "Localization of a passively transferred human recombinant monoclonal antibody to herpes simplex virus glycoprotein D to infected nerve fibers and sensory neurons in vivo", Satna PP, Deerinck TJ, and Ellisman MH, 1999, *Journal of Virology* Oct. Vol 73 (10 8817-23)). Most often, for convenience, so that every antibody does not need to be conjugated to an enzyme, a mouse antibody is used as the specific recognition antibody, then an enzyme-conjugated rabbit-anti-mouse antibody is added.

Using the technology described herein, one can greatly increase the sensitivity of ELISAs and detect the presence of the immobilized target species using a natural ligand (protein or peptide) or a drug candidate as the probe molecule. The presence of the



WU 02/01228

PCT/US91/20168

- 55 -

immobilized species is detected by binding to it a *ligand* attached to a colloid that also presents a plurality of horseradish peroxidase (HRPO) or alkaline phosphatase (AP). The enzyme can be conveniently linked to the colloid by a variety of means, including a histidine-tag attached directly to the enzyme, or by binding a mouse-anti-goat enzyme-conjugated antibody to a goat antibody that is attached to the colloid via a histidine-tagged protein G (Akerstrom, B., Nielson, B., Bjorck, L. Journal of Biological Chemistry, 1987 Oct. 5 Vol. 262 (28); pgs. 13388-91 and Fahnstoeck, S.R., Alexander, P., Nagle, J. and Filipula, D. (1986) Journal of Bacteriology Vol. 167, 870-880). By binding a ligand co-immobilized on a colloid with a plurality of enzymes, to the target species *in place of* a secondary antibody, the ratio of signaling molecules to binding events is increased by orders of magnitude. The binding of one antibody or ligand on the colloid to a presented antigen on an ELISA plate indirectly results in the binding of thousands or millions of enzymes. Alternatively, a known species can purposely be attached to wells of a 96-well plate so that one can probe with colloids that each present a separate drug candidate along with the signaling enzymes. Currently, it is not possible to do this with existing ELISA technology each drug candidate can not be conjugated to an enzyme.

Alternatively, the natural ligand for the immobilized target can be presented on the colloid along with the signaling enzymes and drug candidates added to each well of the plate to disrupt the interaction. Unbound colloids and thus their signal are lost in a wash step. The target for the antibody- or ligand-presenting colloids can be a cell or a protein bound directly or indirectly (via another antibody or ligand) to an ELISA plate. The advantage to this modification of an ELISA is not only sensitivity, but also efficiency. Because several hundred signaling enzymes remain bound via the colloids to one antigen, substrate hydrolysis will occur more quickly, and less time will be needed for an adequate reading.

Example 10: Visual Detection of colloid-immobilized ligand interaction with cell surface receptors and disruption thereof

This example was carried out in a manner as described in Example 3 with the following exceptions. Cells were grown on a multi-well plate. Following interaction, visual inspection showed decoration of the cells with colloids selectively at locations on the cell where the receptor was expressed. Referring to Fig. 29A, a control is shown in which no binding occurred. A random sequence peptide was used. Fig. 29B shows

WO 02/01228

PC/TUS91/2016H

- 56 -

decoration of cells with colloids selectively at locations on the cells where protein was expressed.

Example 11: Detection of binding interaction between binding partners, one bound non-specifically to a solid support, the other to a colloid

5 A protein, specifically streptavidin (Promege) was non-specifically attached to a solid support, specifically Q-sepharose beads. Its binding partner, biotin, was covalently attached to a thiol incorporated into a self-assembled monolayer on colloid particles. Exposure of the colloid particles to the beads resulted in immobilization via binding between the biotin and the streptavidin, coloring the beads red. Fig. 30A is a photocopy  
10 of a computer-digitized microscope image of beads decorated (red, originally) by the binding interaction. Fig. 30B (control), shows a similar image of beads that were not decorated: similar beads (streptavidin-bound) exposed to colloids presented an irrelevant protein.

This example also, importantly, describes a self-assembled monolayer comprising  
15 biotin on a colloid particle. Biotin SAMs were formed on colloids as follows. A solution in DMF was made including 580 micromolar COOH terminated thiol and 20 micromolar biotin-terminated thiol. Thiols were C11. Colloid preparation was carried out as described above, in which the described DMF solution of 20 micromolar biotin and 580 micromolar COOH thiols were incubated with the colloids. Other steps were as  
20 above.

Example 12: ELISA with multiple signaling of a single binding event

This example was run similarly to typical ELISA assays with the following exceptions/details: detergents and surfactants were omitted from wash steps. GST was immobilized onto a multi-well plate. Mouse anti-GST antibody was added to the wells  
25 and bound to GST. After a typical wash step, in one set of wells (experimental) colloids presenting histidine-tagged Protein G were added and bound to anti-GST. A second set of wells (control) was not exposed to the Protein G-immobilized colloids. Following another typical wash step, all wells were exposed to horse radish peroxidase-linked goat anti-mouse antibody. All were then exposed to typical horse radish peroxidase substrate  
30 and sulphuric acid. The reaction was allowed to develop in the normal manner. Plates were analyzed in a multi-well spectrophotometer reader.

WO 02/01228

PC/TUS91/20168

- 57 -

The result of this example shows six orders of magnitude greater signaling in the experimental wells compared to the control wells, as horse radish peroxidase linked to multiple G locations on colloid particles. Fig. 31 is a bar graph showing this six order of magnitude increase. This example shows signaling of a single binding of a first biological or chemical agent to a second biological or chemical agent with a plurality of signaling entities. The signaling of the plurality of entities occurs simultaneously as they bind to the colloid particle.

Example 13: Attachment of Unmodified Chemical or Biological Molecules to Self-Assembled Monolayers Presented on Surfaces of Colloids. Specifically, Attachment of Streptavidin to Colloids

This example provides a technique for the attachment of essentially any amino-containing entity to a surface able to present a carboxylic acid or salt thereof. The technique can be used to attach the entity to a colloid, via attachment to a self-assembled monolayer formed on a surface of a colloid. The molecule that is attached to the self-assembled monolayer need not include any particular chemical functionality, such as an affinity tag or the like, prior to attachment. The only requirement is that the molecule include at least one primary amine, such as are found in many amino acids. Accordingly, the technique is particularly well-suited for the covalent attachment of proteins or peptides that carry primary amino groups to colloids that present carboxylic acids at their surfaces.

Techniques for formation of self-assembled monolayers on colloids are described above. These techniques were followed, with the following specific details and provisions.

A protein was attached by forming an amide bond between a carboxylate on a colloid surface (attached via a SAM) and an amine residue of the peptide. The amide bond was formed by the application of a modified EDC/NHS coupling protocol. The success of the coupling was tested by mixing colloids presenting streptavidin with colloids presenting biotin groups (via a biotin SAM, described previously). If the streptavidin was successfully attached then the two types of colloids would aggregate and the suspension would change color and, ultimately, the colloids would precipitate out leaving a clear solution.

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 58 -

The colloids used for the coupling procedure were prepared as described elsewhere and were formed by incubation in a thiol solution containing 540 $\mu$ M (micromolar) COOH-terminated thiol, 60 $\mu$ M NTA-terminated thiol, and then heat cycling in 400 $\mu$ M ethylene glycol-terminated thiol. 50 $\mu$ l of colloids in PBS were treated with 50 $\mu$ l of 10mM EDC, 40mM NHS in water. After 7 min the colloids were spun down, the liquid was removed, and the colloids were resuspended in 50 $\mu$ l (microliter) of 0.1mg/ml streptavidin in phosphate buffer, pH 6.4. After 1.5 h, unreacted sites on the colloids were blocked by adding ethanolamine and the colloids were spun down, then resuspended in 100  $\mu$ l of pH 6.4 phosphate buffer to wash away excess, uncoupled streptavidin. Colloids were then spun down again and resuspended in 50 $\mu$ l PBS. To a mixture of 20  $\mu$ l of phosphate buffer and 15 $\mu$ l of biotin-presenting colloids was added 15 $\mu$ l of streptavidin-presenting colloids prepared above. This suspension was compared to a mixture of 35 $\mu$ l of phosphate buffer and 15 $\mu$ l of biotin-presenting colloids. The addition of streptavidin-presenting colloids caused an immediate change in color from red to blue. After ~10 min the mixture of biotin colloids and streptavidin colloids appeared clear with precipitate on the bottom. The mixture that did not contain the biotin colloids remained red with no visible change.

The above-described protocol is applicable to attachment of essentially any chemical or biological molecule including an amine to a self-assembled monolayer on a colloid. To ensure binding of a molecule to only one colloid, rather than binding to multiple colloids which could result in aggregation, the following adjustments can be made if appropriate. The concentration of colloid in solution can be decreased, while maintaining concentration of molecule desirably attached and maintaining concentration of EDC/NHS reactant. Other slight modifications can be made by those of ordinary skill in the art for various molecules. Amino-containing molecules can be selected by those of ordinary skill in the art and include, without limitation, proteins, synthetic molecules, peptides, derivatized nucleic acids, and other derivatized or naturally-occurring biological molecules that contain amines. As would be appreciated by those of ordinary skill in the art, a wide variety of species can be synthesized with or attached to amines or amine-containing species to render them attachable to a colloid according to this embodiment of the invention.

WO 02/01228

PC/T/US91/20368

- 59 -

Those skilled in the art would readily appreciate that all parameters listed herein are meant to be exemplary and that actual parameters will depend upon the specific application for which the methods and apparatus of the present invention are used. It is, therefore, to be understood that the foregoing embodiments are presented by way of  
5 example only and that, within the scope of the appended claims and equivalents thereto, the invention may be practiced otherwise than as specifically described.

What is claimed is:

WO 02/1228

PCT/US91/2016H

- 60 -

1. A method comprising:  
allowing a colloid particle the ability to become immobilized with respect to a  
non-colloidal structure; and  
5 determining immobilization of the colloid particle relative to the non-colloidal  
structure.
2. A method as in claim 1, wherein the colloid particle comprises an auxiliary  
signaling entity.
- 10 3. A method as claim 2, wherein the auxiliary signaling entity comprises a dye,  
pigment, electroactive molecule, chemiluminescent moiety, electrochemiluminescent  
moiety, fluorescent moiety, up-regulating phosphor, or enzyme-linked signaling moiety  
including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase.
- 15 4. A method as in claim 3, wherein the signaling entity comprises a metallocene.
5. A method as in claim 4, wherein the signaling entity comprises ferrocene or a  
ferrocene derivative.
- 20 6. A method as claim 1, comprising allowing a plurality of colloid particles to fasten  
to the non-colloidal structure, and determining fastening of the plurality of particles to  
the non-colloidal structure.
- 25 7. A method as in claim 6, wherein the plurality of colloid particles comprises  
auxiliary signaling entities.
8. A method as in claim 7, wherein the auxiliary signaling entities comprise a dye,  
pigment, electroactive molecule, chemiluminescent moiety, electrochemiluminescent  
30 moiety, fluorescent moiety, up-regulating phosphor, or enzyme-linked signaling moiety  
including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase.

WO 02/01228

PCT/US91/20368

- 61 -

9. A method as in claim 1, further comprising providing a biological or chemical agent linked to or adapted for linkage to the non-colloidal structure, and a binding partner of the biological or chemical agent linked to or adapted for linkage to the particle, the allowing step comprising allowing the particle to become linked to the non-colloidal structure via the agent and the binding partner.
10. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a bead.
11. A method as in claim 10, wherein the bead comprises polymeric material, agarose, tectagel, and/or magnetic material.
12. A method as in claim 11, wherein the bead is a polystyrene bead.
13. A method as in claim 9, comprising allowing the agent to be linked to the non-colloidal structure, the binding partner to be linked to the particle, and the agent and the binding partner to bind to each other.
14. A method as in claim 13, comprising allowing the agent and the binding partner to biologically bind to each other.
15. A method as in claim 9, wherein the biological or chemical agent is a drug candidate, and the binding partner is a target of the drug candidate.
16. A method as in claim 15, wherein the non-colloidal structure is a bead.
17. A method as in claim 15, wherein the non-colloidal structure is a surface of an essentially planar substrate or chip.
18. A method as in claim 9, wherein the biological or chemical agent is a nucleic acid sequence.

WO 02/01228

PCT/US01/20368

- 62 -

19. A method as in claim 9, wherein the biological or chemical agent is a peptide, and the binding partner is a binding partner of the peptide.
20. A method as in claim 9, wherein the biological or chemical agent is a protein, and the binding partner is a binding partner of the protein.
21. A method as in claim 1, wherein the colloid particle carries an immobilized ligand, and the non-colloidal structure carries a binding partner to the ligand, the method comprising allowing the colloidal particle the ability to fasten to the non-colloidal structure in the presence of a candidate drug for interruption of binding of the ligand to the target.
22. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a bead, further comprising providing a plurality of beads, a plurality of biological or chemical agents adapted for linkage to the beads, a plurality of particles, and a plurality of binding partners of the biological or chemical agents adapted for linkage to the particles, wherein at least some of the agents and the binding partners are suspected of having the ability to bind to each other, the method comprising exposing at least some of the beads to at least some of the particles, and determining immobilization of the particles on the beads.
23. A method as in claim 22, wherein the biological or chemical agents are drug candidates and the binding partners are targets of the drug candidates, the method comprising providing at least a first and a second bead in two separate locations, each carrying a different immobilized drug candidate, exposing the plurality of particles to the at least two beads, and differentiating linkage of the particles to the first bead versus the second bead.
24. A method as in claim 23, wherein the at least two beads are separately located in at least two different wells of a multi-well plate.
25. A method as in claim 22, wherein the biological or chemical agents are drug candidates and the binding partners are targets of the drug candidates, the method



WU 02/01228

ECT/US91/2016H

- 63 -

comprising providing at least two beads carrying a drug candidate in two separate locations, exposing the first bead to a first set of colloid particles carrying a first target of the drug candidate, and exposing the second bead to a second set of colloid particles carrying a second target of the drug candidate, and differentiating linkage of the first set of particles to the first bead versus the second set of particles to the second bead.

26. A method as in claim 9, comprising determining immobilization of the particle on the non-colloidal structure by determining a change in spectrum of absorbed or transmitted electromagnetic radiation interacting with the particle.

10 27. A method as in claim 9, comprising determining immobilization of the particles on the non-colloidal structure by visual inspection.

28. A method as in claim 22, comprising providing a plurality of the beads and agents linked to the beads, a plurality of the particles and binding partners linked to the particles, and exposing the particles to the beads and determining immobilization of the particles on the beads.

29. A method as in claim 9, wherein at least one of the agent or binding partner is adapted for linkage to the non-colloidal structure or particle, respectively, via an affinity tag/binding partner linkage.

30. A method as in claim 9, wherein at least one of the agent or binding partner is adapted for linkage to the non-colloidal structure or particle, respectively, via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

31. A method as in claim 30, wherein at least one of the agent or binding partner carries immobilized thereto a chelate coordinating a metal, and at least one of the agent or binding partner is derivatized with a polyamino acid tag.

30

WO 02/01220

PCT/US91/20160

- 64 -

32. A method as in claim 9, wherein at least one of the agent or binding partner is adapted for linkage to the non-colloidal structure or particle, respectively, via a self-assembled monolayer.
- 5 33. A method as in claim 9, wherein at least one of the agent or binding partner is adapted for linkage to the bead or particle, respectively, via complementary nucleic acid sequence pairs.
34. A method as in claim 9, wherein the binding partner is adapted for linkage to the  
10 particle via glutathione/glutathione-s-transferase ligand interaction.
35. A method as in claim 9, comprising:  
providing at least a first and a second non-colloidal structure comprising  
polymeric beads and at least a first and a second agent linked to the first and second  
15 beads, respectively;  
providing a plurality of colloid particles each carrying immobilized thereto a  
suspected binding partner of the first and/or second agent;  
exposing the beads to the particles; and  
differentiating linkage of the particles to the first bead vs. the second bead.
- 20 36. A method as in claim 35, wherein the first and second agents linked to the first and second polymeric beads are suspected of biological or chemical interaction with the binding partner, and the differentiating step comprises differentiating biological interaction between the first agent and the binding partner vs. the second agent and the  
25 binding partner.
37. A method as in claim 9, comprising:  
providing a plurality of non-colloidal structures comprising beads each carrying  
the agent immobilized thereto;  
30 providing a first set and a second set of colloid particles, the first set each carrying immobilized thereto a first suspected binding partner of the agent and the

WO 02/01220

PCT/US01/20168

- 65 -

second set each carrying immobilized thereto a second suspected binding partner of the agent;

exposing at least a first of the beads to the first set of particles and at least a second of the beads to the second set of particles;

5 differentiating linkage of the first set of particles to the first bead vs. the second set of particles to the bead.

38. A method as in claim 37, wherein the first and second suspected binding partners are suspected of biological or chemical interaction with the agent, and the differentiating  
10 step comprises differentiating biological interaction between the agent and the first suspected binding partner vs. the agent and the second suspected binding partner.

39. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a cell.

15 40. A method as in claim 39, further comprising providing a ligand for a receptor or protein at a surface of the cell, adapted for linkage to the particle, the allowing step comprising allowing the particle to be linked to the cell via the ligand interacting with the receptor or protein.

20 41. A method as in claim 39, wherein the ligand is adapted for linkage to the particle via a self-assembled monolayer.

42. A method as in claim 40, wherein the ligand is a peptide, protein, antibody, enzyme, or small molecule.

25 43. A method as in claim 40, wherein the ligand is adapted for linkage to the particle via an affinity tag/binding partner linkage.

30 44. A method as in claim 40, wherein the ligand is adapted for linkage to the particle via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

WO 02/01228

PC/T/US91/20168

- 66 -

45. A method as in claim 42, wherein the ligand carries a polyamino acid tag and the particle carries an immobilized chelate coordinating a metal.
46. A method as in claim 45, wherein the chelate is nitrilotriacetic acid.
- 5 47. A method as in claim 45, wherein the particle carries a self-assembled monolayer including the nitrilotriacetic acid.
48. A method as in claim 45, wherein the particle carries a self-assembled monolayer including the immobilized chelate.
- 10 49. A method as in claim 40, comprising exposing the ligand and the particle to the cell, allowing the ligand to link to the particle, and determining fastening of the ligand to the receptor or protein.
- 15 50. A method as in claim 39, comprising determining immobilization of the particle on the cell by determining a change in spectrum of absorbed or transmitted electromagnetic radiation interacting with the particle.
- 20 51. A method as in claim 39, comprising determining immobilization of the particle on the cell electronically.
52. A method as in claim 51, comprising determining immobilization of the particle on the cell via alternating current voltammetry.
- 25 53. A method as in claim 50, comprising determining immobilization of the particle on the cell by visual inspection.
54. A method as in claim 39, comprising:
- 30 providing a cell presenting a receptor or protein at a surface thereof;  
providing a colloid particle; and  
allowing the colloid particle to fasten to the receptor or protein.

WO 02/01220

PCT/US99/20368

- 67 -

55. A method as in claim 54, wherein the colloid particle includes an auxiliary signaling entity.

5 56. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a cell exposing a receptor or protein at a surface thereof, further comprising providing a ligand for the receptor or protein adapted for linkage to the particle and exposing the ligand and the particle to the cell in the presence of a candidate drug for disruption of interaction between the ligand and the receptor or protein; and  
10 determining fastening of the particle to the cell.

57. A method as in claim 56, wherein the determining step involves determining inhibition of fastening of the particle to the cell indicative of effectiveness of the candidate drug in disrupting receptor or protein/target protein interaction.

15 58. A method as in claim 56, comprising providing at least a first and a second cell in separate locations, exposing the first cell to a ligand for a cell receptor or protein of the first cell and a colloid particle, the ligand adapted for linkage to the particle, and a first candidate drug for disruption of interaction between the ligand and the receptor or protein, and adding to the second cell the ligand and the colloid and a second candidate  
20 drug for disruption of interaction between the ligand and the receptor or protein, and differentiating linkage of the particle to the first cell versus the second cell.

59. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a cell exposing a  
25 receptor or protein at a surface thereof, further comprising:  
providing at least two of the cells in separate locations;  
exposing each of the cells to a different target protein to a cell receptor or protein  
and a colloid particle adapted for linkage to the respective target protein; and  
determining fastening of the particles to the cells indicative of binding of the  
30 different target proteins to the cell receptor or proteins.

WO 02/01228

ECT/US01/20168

- 68 -

60. A method as in claim 9, wherein the non-colloidal structure is a magnetic bead and the colloid particle comprises an auxiliary signaling entity.

61. A method as in claim 60, wherein the signaling entity is a metallocene.

5

62. A method as in claim 60, wherein the signaling entity is ferrocene or a ferrocene derivative.

63. A method as in claim 60, comprising exposing the particle to the bead in the presence of the agent and the binding partner further in the presence of an enzyme having the ability to cleave the agent or binding partner.

64. A method as in claim 63, comprising first exposing the agent and the binding partner to the enzyme, then exposing the particle and the bead to the agent and the binding partner.

15

65. A method as in claim 63, comprising exposing the particle to the bead in the presence of the agent, the binding partner, and the enzyme further in the presence of a candidate drug for modulation of activity of the enzyme.

20

66. A method as in claim 65, wherein the binding partner comprises a protein or peptide that can be cleaved by the enzyme.

67. A method as in claim 66, wherein the protein is adapted for linkage to the colloid and to the bead.

25

68. A method as in claim 67, wherein the protein includes a metal binding tag and biotin, one of the colloid or the bead includes a chelate coordinating a metal, and the other of the colloid or bead includes streptavidin.

30

WU 02/01228

PCT/US01/20168

- 69 -

69. A method as in claim 67, wherein the protein includes a metal binding tag and biotin, the colloid includes a chelate coordinating a metal, and the bead includes streptavidin.

5 70. A method as in claim 60, wherein the signaling entity is a metallocene and the binding partner comprises a protein that can be cleaved by an enzyme, comprising exposing the particle to the bead in the presence of the agent, the binding partner, and the enzyme further in the presence of a candidate drug for moderation of activity of the enzyme, magnetically drawing the bead into proximity with an electrode, and  
10 determining proximity of the metallocene to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in inhibiting cleavage activity of the enzyme.

71. A method as in claim 1, comprising exposing the colloid particle and the non-  
15 colloidal structure to an entity adapted for linkage both to the colloid particle and to the non-colloidal structure in the presence both of an enzyme having the ability to cleave the entity and a candidate drug for moderation of activity of the enzyme.

72. A method as in claim 71, wherein the non-colloidal structure is a magnetic bead  
20 and the colloid particle carries an immobilized electroactive species, the method comprising magnetically drawing the bead into proximity with an electrode, and determining proximity of the electroactive species to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in inhibiting cleavage activity of the enzyme.

25 73. A method as in claim 71, wherein the non-colloidal structure is a surface of an electrode and the colloid particle carries an immobilized electroactive species, the method comprising exposing the electrode to the colloid particle, the entity adapted for linkage both to the colloid particle and to the electrode, the enzyme, and the candidate  
30 drug and determining proximity of the electroactive species to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in inhibiting cleavage activity of the enzyme.

WO 02/01228

ECT/US91/2016H

- 70 -

74. A method as in claim 1, comprising exposing the colloid particle and the non-colloidal structure to a substrate for an enzyme adapted for linkage to the non-colloidal structure, a molecular species linkable to the substrate via enzyme activity adapted for linkage to the particle, and an enzyme for the substrate.
75. A method as in claim 74, further comprising exposing the colloid particle and the non-colloidal structure to a candidate drug for moderation of activity of the enzyme.
76. A method as in claim 74, wherein the non-colloidal structure is a magnetic bead and the colloid particle carries an immobilized electroactive entity, the method comprising magnetically drawing the bead into proximity with an electrode, and determining proximity of the electroactive entity to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in moderating activity of the enzyme.
77. A method as in claim 74, wherein the non-colloidal structure is a surface of an electrode and the colloid particle carries an immobilized electroactive entity, the method comprising exposing the electrode surface to the colloid particle, the substrate, the enzyme, and the candidate drug and determining proximity of the electroactive entity to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in moderating activity of the enzyme.
78. A method as in claim 74, wherein the non-colloidal structure is a magnetic bead.
79. A method as in claim 78, wherein the colloid particle comprises an auxiliary signaling entity.
80. A method as in claim 78, wherein the signaling entity is a metallocene.
81. A method as in claim 80, wherein the signaling entity is ferrocene or a ferrocene derivative.



WO 02/01220

ECT/US91/2016H

- 71 -

82. A method as in claim 78, comprising exposing the particle to the bead in the presence of the substrate and the binding partner further in the presence of a candidate drug for moderation of activity of the enzyme.
- 5 83. A method as in claim 82, wherein the binding partner is adapted for linkage to the particle via a metal binding tag/metal/chelate linkage and the substrate is adapted for linkage to the bead via biotin/streptavidin linkage.
- 10 84. A method as in claim 82, wherein the signaling entity is a metallocene, further comprising magnetically drawing the bead into proximity with an electrode, and determining proximity of the metallocene to the electrode by activating the electrode thereby determining effectiveness of the drug candidate in moderation of activity of the enzyme.
- 15 85. A method comprising:  
signaling a single binding of a first biological or chemical agent to a second biological or chemical agent with a plurality of signaling entities.
- 20 86. A method as in claim 85, comprising signaling the single binding with the plurality of signaling entities simultaneously.
87. A method as in claim 85, comprising providing the first agent carrying the plurality of signaling entities, allowing the first agent to bind to the second agent, and  
25 determining the binding via the signaling entities.
88. A method as in claim 87, wherein the first agent is linked to a particle to which the signaling entities are immobilized.
- 30 89. A method as in claim 87, wherein the first agent is linked to the signaling entities via a polymer.

WU 02/0122H

PC/770501/2016H

- 72 -

90. A method as in claim 87, wherein the first agent is linked to the signaling entities via a dendrimer.
91. A method as in claim 87, wherein the first agent is a biological or chemical ligand, and the second agent is a cell presenting a receptor or protein at a surface thereof the method comprising allowing the ligand to fasten to the receptor or protein.
92. A method as in claim 87, wherein the plurality of signaling entities comprises a plurality of signaling entities linked to a polymer that is linked to the first agent.
93. A method as in claim 87, wherein the plurality of signaling entities comprises a plurality of signaling entities linked to a dendrimer that is linked to the first agent.
94. A method as in claim 87, wherein the first agent is fastened to a colloid particle that includes a plurality of immobilized signaling entities.
95. A method as in claim 85, wherein the plurality of signaling entities comprises a plurality of electroactive molecules.
96. A method as in claim 95, wherein the plurality of electroactive molecules comprises a plurality of metallocenes.
97. A method as in claim 95, wherein the plurality of electroactive molecules comprises a plurality of ferrocene or a ferrocene derivatives.
98. A method as in claim 92, wherein the polymer is linked to the first agent via an affinity tag/binding partner linkage.
99. A method as in claim 92, wherein the polymer is linked to the first agent via a binding tag/metal/chelate linkage.

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 73 -

100. A method as in claim 99, wherein the first agent carries a polyanino acid tag and the polymer carries a chelate coordinating a metal.
101. A method as in claim 93, wherein the dendrimer is linked to the first agent via a binding tag/metal/chelate linkage.
102. A method as in claim 101, wherein the first agent carries a polyanino acid tag and the dendrimer carries a chelate coordinating a metal.
103. A method as in claim 85, wherein at least one of the signaling entities comprises a dye, pigment, electroactive molecule, fluorescent moiety, up-regulating phosphor, or enzyme-linked signaling moiety including horso radish peroxidase and alkaline phosphatase.
104. A method comprising:  
determining protein/ligand interaction in the absence of SPR without labeling either the protein or the ligand.
105. A method as in claim 104, comprising exposing a ligand to a protein suspected of interacting with the ligand, the ligand in fixed proximal relationship with an electroactive entity having an electroactive signal dependant upon proximity to the protein.
106. A method as in claim 104, the electroactive entity having an electroactive signal that is alterable dependent upon altered proximity between the electroactive entity and the protein.
107. A method as in claim 104, comprising exposing a protein to a surface at which both the ligand and the electroactive entity are immobilized.
108. A method as in claim 107, wherein the surface is a surface of an electrode.

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 74 -

109. A method as in claim 107, wherein the ligand and electroactive entity each form part of a self-assembled monolayer at the surface.

110. A method as in claim 109, the self-assembled monolayer including a species that enhances permeability of the self-assembled monolayer to electrons.

111. A method as in claim 110, wherein the species that enhances permeability to electrons comprises a conductive self-assembled monolayer-forming species.

112. A method as in claim 110, wherein the species that enhances permeability to electrons comprises a species that causes defect sites in the self-assembled monolayer

113. A method as in claim 104, wherein the electroactive entity comprises a metallocene.

114. A method as in claim 104, wherein the electroactive entity comprises a ferrocene or a ferrocene derivative.

115. A method as in claim 104, wherein the electroactive entity comprises ferrocene dicarboxylic acid.

116. A method as in claim 109, wherein the ligand is linked to a self-assembled monolayer-forming species via an affinity tag/binding partner linkage.

117. A method as in claim 109, wherein the ligand is linked to a self-assembled monolayer-forming species via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

118. A method, comprising:

a) providing i) a solution comprising colloids, said colloids comprising a ligand capable of interacting with a cell surface molecule and ii) a composition comprising an electrode comprising growing cells, said cells comprising at least one cell surface molecule capable of interacting with said ligand,

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 75 -

b) adding at least a portion of said colloids to said composition.

119. The method of claim 118, further comprising:

c) detecting the aggregation of said colloids as a measure of the interaction of  
5 said ligand with said cell surface molecule.

120. The method of claim 118, wherein said colloid is a gold colloid.

121. The method of claim 120, wherein said gold colloid, prior to step (a), is treated  
10 so as to incorporate thiol groups.

122. The method of claim 118, wherein, prior to step (a), said ligand is derivatized  
with a moiety that has a binding partner.

15 123. The method of claim 122, wherein, prior to step (a), said ligand is derivatized  
with a moiety that can bind to a metal chelate.

124. The method of claim 123, wherein said moiety comprises a histidine tag.

20 125. A method, comprising:

a) providing i) a solution comprising colloids, said colloids comprising a  
ligand capable of interacting with a cell surface molecule, ii) a candidate drug, and iii) a  
composition comprising an electrode comprising growing cells, said cells comprising at  
least one cell surface molecule capable of interacting with said ligand,

25 b) mixing at least a portion of said colloids with said drug and said  
composition.

127. A method comprising:

recruiting an electronic signaling entity to an electrode using a magnetic material.  
30

WU 02/0122H

PCT/US91/2016H

- 76 -

127. A method as in claim 126, comprising recruiting the signaling entity to the electrode in part via protein/protein linkage involved in immobilization between the signaling entity and the magnetic material.

5 128. A method as claim 127, wherein the protein/protein linkage involves proteins that are not antibodies.

129. An article defining a surface, and a ligand suspected of interacting with a protein and an electroactive entity each immobilized relative to the surface.

10

130. An article as in claim 129, further comprising a species that enhances permeability of the surface to electrons immobilized relative to the surface.

131. An article comprising:

15 a first biological or chemical agent, capable of biological or chemical binding to a second agent, immobilized relative to a plurality of signaling entities.

132. An article as in claim 131, wherein the first agent is linked to a particle to which the signaling entities are immobilized.

20

133. An article as in claim 131, wherein the first agent is immobilized relative to the signaling entities via a polymer.

25 134. An article as in claim 131, wherein the first agent is immobilized relative to the signaling entities via a dendrimer.

135. An article defining a surface, and a self-assembled monolayer formed on the surface of the article, the monolayer comprising a mixture of a first molecular species having a molecular structure promoting self-assembly at the surface with other first species in a tightly-packed manner preventing fluid to which the surface is exposed from communicating electrically with the surface, and a second molecular species having a molecular structure different from the first species in such a way to cause disruption of

30

WO 02/01228

ECT/US01/20168

- 77 -

the tightly-packed self-assembled structure thereby defining defects in the tightly-packed structure allowing fluid to which the surface is exposed to communicate electrically with the surface.

5 136. An article as in claim 135, wherein the first species is essentially linear and the second species includes at least one non-linear portion.

137. A composition, comprising a first molecule and one or more signaling entities attached to a solid support, wherein said first molecule is a ligand capable of interacting  
10 with a cell-surface receptor or protein.

138. The composition of claim 137, wherein said solid support is a colloid.

139. The composition of claim 138, wherein said colloid is a gold colloid.

15 140. The composition of claim 138, wherein said ligand is covalently attached directly to said colloid.

141. The composition of claim 138, wherein said signaling entities are electroactive  
20 molecules.

142. The composition of claim 141, wherein said electroactive molecules comprise ferrocene or a ferrocene derivative.

25 143. The composition of claim 137, wherein said ligand is a peptide.

144. The composition of claim 143, wherein said peptide is derivatized with a moiety that can bind to a metal cation.

30 145. The composition of claim 144, wherein said moiety comprises a histidine tag.

WO 02/01228

PCT/US98/20168

- 78 -

146. The composition of claim 144, wherein said solid support comprises a metal chelate and said peptide is attached to said solid support via binding of said moiety to said metal chelate.

5 147. The composition of claim 137, wherein said support comprises a monolayer of a second molecule.

148. The composition of claim 147, wherein said monolayer is a self-assembling monolayer.

10

149. The composition of claim 147, wherein said second molecule is a thiol.

150. A composition, comprising a first molecule, a second molecule and a third molecule attached to a solid support, wherein said first molecule comprises a ligand capable of interacting with a cell-surface receptor or protein, wherein said second molecule forms a monolayer on said solid support, and wherein said third molecule is electroactive.

15

151. The composition of claim 150, wherein said solid support is a colloid.

20

152. The composition of claim 151, wherein said colloid is a gold colloid.

153. The composition of claim 151, wherein said ligand is covalently attached directly to said colloid.

25

154. The composition of claim 153, wherein said electroactive molecule comprises ferrocene or a ferrocene derivative.

155. The composition of claim 153, wherein said ligand is a peptide.

30

156. The composition of claim 155, wherein said peptide is derivatized with a moiety that can bind to a metal chelate.



WU 02/01228

PCT/US01/20168

- 79 -

157. The composition of claim 156, wherein said moiety comprises a histidine tag.
158. The composition of claim 156, wherein said solid support comprises a metal  
5 chelate and said peptide is attached to said solid support via binding of said moiety to  
said metal chelate.
159. The composition of claim 137, wherein said solid support is a liposome.
- 10 160. The composition of claim 147, wherein said liposome comprises at least one lipid  
containing a reactive group.
161. An article comprising a metal support constructed and arranged to support the  
growth of cells on a surface thereof, said metal support comprising a monolayer of at  
15 least one type of molecule, said monolayer configured such that metal support can be  
used as an electrode.
162. An article as in claim 161, further comprising cells growing on the metal support.
- 20 163. A composition comprising:  
a colloid particle  
a signaling entity immobilized relative to the colloid particle; and  
a protein immobilized relative to the colloid particle.
- 25 164. A species comprising:  
a polymer or dendrimer carrying a plurality of signaling entities adapted for  
linkage to a biological or chemical agent.
165. A species as in claim 164, wherein the polymer or dendrimer is adapted for  
30 linkage to the chemical or biological agent via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

WJ 02/0122H

PC/T/US91/2016H

- 80 -

166. A species as in claim 164, wherein the polymer or dendrimer carries a chelate that can coordinate a metal.
167. A species as in claim 164, wherein the polymer or dendrimer carries a plurality of electroactive species.
168. A species as in claim 164, wherein the polymer or dendrimer carries a plurality of metalloenes.
169. A species as in claim 164, wherein the polymer or dendrimer carries a plurality of ferrocene or a ferrocene derivatives.
170. An article comprising a colloid particle immobilized relative to a glutathione derivative and at least one signaling entity.
171. An article comprising a colloid particle carrying on a surface thereof a self-assembled monolayer comprising a glutathione derivative.
172. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a biological specimen.
173. A method as in claim 172, wherein the biological specimen is taken from a human or animal.
174. A method as in claim 173, wherein the biological specimen comprises cells or a tissue section.
175. A method as in claim 172, comprising providing at least a first and a second biological specimen;
- exposing the first and second specimens to colloid particles carrying immobilized species suspected of or having the ability to bind to binding partners presented by the specimens.

WO 02/01228

PCT/US98/20168

- 81 -

176. A method as in claim 175, wherein the first and second biological specimen of are different states of infection or disease.

5 177. A method as in claim 175, comprising determining a difference in binding of the colloid particles to the first specimen as opposed to the different specimen.

178. A method as in claim 177, wherein the difference comprises a difference in level of binding.

10

179. A method as in claim 177, wherein the difference is a difference in pattern of colloid immobilization.

180. A method as in claim 175, further comprising:

15 determining immobilization of the colloid particles to either or both of the specimens

181. A method as in claim 175, wherein the biological specimen or its source has been pre-treated with a candidate drug for modification of a disease state that can be determined by expression level and/or pattern of binding partners expressed by the specimen.

20

182. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure comprises an article defining a surface, and a self-assembled monolayer formed on the surface of the article, the monolayer comprising a mixture of a first molecular species having a molecular structure promoting self-assembly at the surface with other first species in a tightly-packed manner preventing fluid to which the surface is exposed from communicating electrically with the surface, and a second molecular species that comprises a molecular wire.

25

183. A method as in claim 1, wherein the non-colloidal structure is a solid support.

30

WO 02/01228

PCT/US91/20168

- 82 -

184. A method as in claim 183, wherein the surface is a surface of an electrode.

185. A method as in claim 183, further comprising a ligand and an electroactive entity each forming part of a self-assembled monolayer at a surface of the colloid particle.

5

186. A method as in claim 185, the self-assembled monolayer including a species that enhances permeability of the self-assembled monolayer to electrons.

187. A method as in claim 186, wherein the species that enhances permeability to electrons comprises a conductive self-assembled monolayer-forming species.

10

188. A method as in claim 186, wherein the species that enhances permeability to electrons comprises a species that causes defect sites in the self-assembled monolayer

189. A method as in claim 184, wherein the electroactive entity comprises ferrocene dicarboxylic acid.

15

190. A method as in claim 185, wherein the ligand is linked to a self-assembled monolayer-forming species via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

20

191. A method as in claim 183, wherein the solid support comprises a substantially planar substrate.

192. A method as in claim 183, wherein the surface of the article carries a self-assembled monolayer.

25

193. A method as in claim 192, wherein the self-assembled monolayer is a conductive self-assembled monolayer.

194. A method as in claim 192, wherein the self-assembled monolayer includes a binding partner for an affinity tag.

30

WO 02/01228

PCT/US01/20168

- 83 -

195. A method as in claim 194, wherein the binding partner is a chelate able to coordinate a metal.
196. A method as in claim 194, wherein the binding partner for the affinity tag  
5 comprises glutathione or biotin.
197. A method as in claim 193, further comprising a chemical or biological agent fastened to the self-assembled monolayer via EDC/NHS coupling chemistry.
- 10 198. A method as in claim 193, comprising a plurality of chemical or biological binding partners fastened to the self-assembled monolayer and distributed randomly across the self-assembled monolayer.
199. A method as in claim 193, wherein the self-assembled monolayer includes  
15 isolated regions each further comprising a unique chemical or biological binding partner fastened thereto.
200. A method as in claim 182, wherein the colloidal structure includes a chemical or biological agent fastened thereto that is a binding partner or is suspected of being a  
20 binding partner of a chemical or biological agent fastened to the surface of the article.
201. A method as in claim 200, wherein the colloidal particle includes an auxiliary signaling entity.
- 25 202. A method as in claim 200, further comprising a self-assembled monolayer on the surface of the colloidal particle.
203. A method as in claim 201, wherein the auxiliary signaling entity is an electroactive signaling entity.
- 30 204. A method as in claim 201, wherein the auxiliary signaling entity is a visible signaling entity.

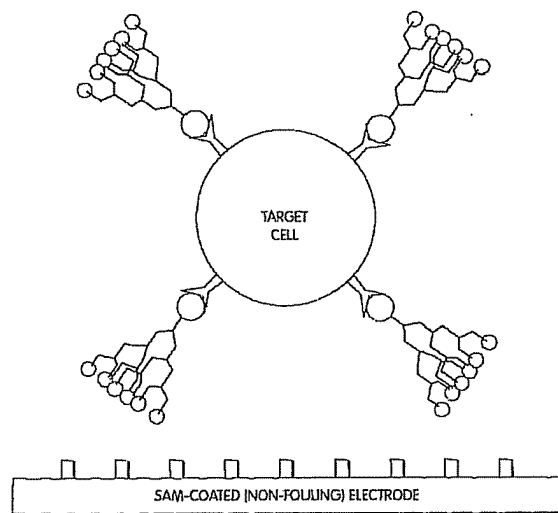


Fig. 1

WU 02/0122H

PCT/US01/20368

2/32

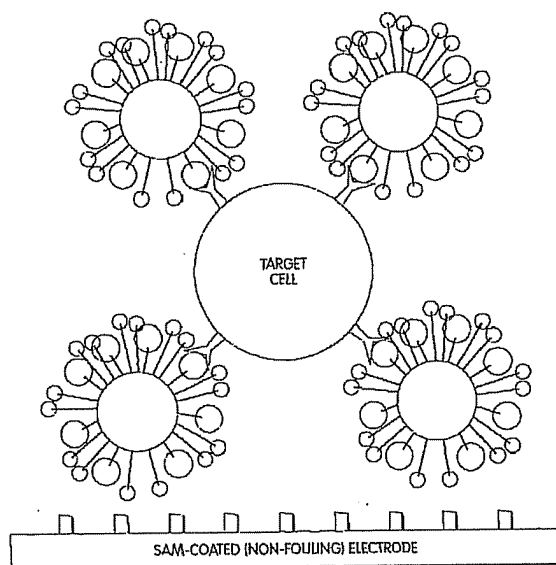


Fig. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/0122H

EC/T/US91/2036H

3/32

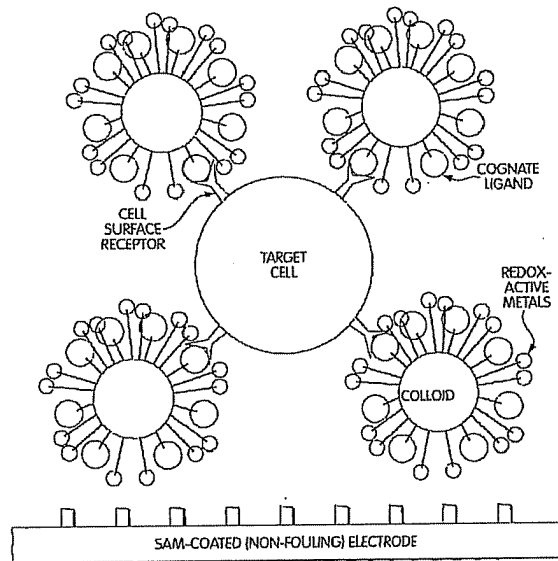


Fig. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/01228

PC17/US91/20368

4/32

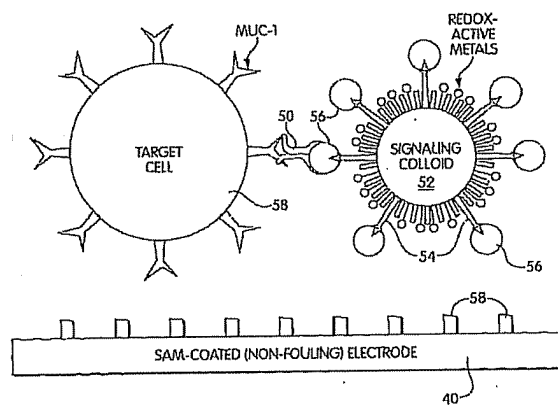


Fig. 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

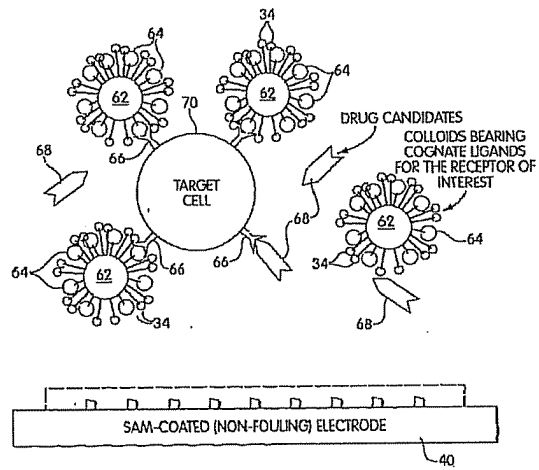


Fig. 5

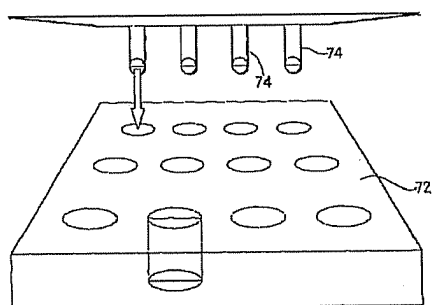


Fig. 6

WO 02/01228

PC17/US01/20368

7/32

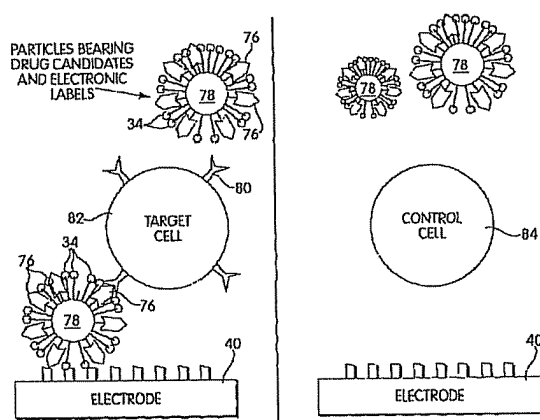


Fig. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

PC/T/US91/20168

8/32

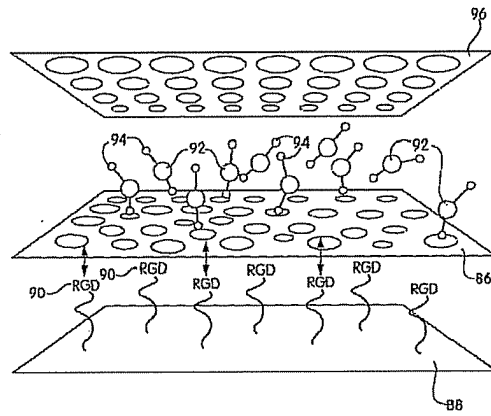


Fig. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

PC17US01/2036H

9/32

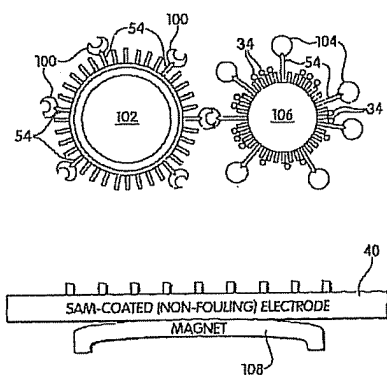


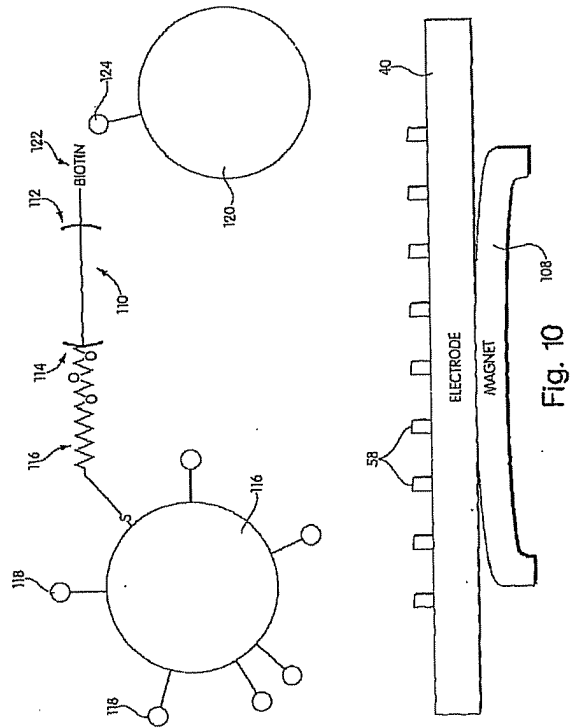
Fig. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01229

02/17/03 11/20/03 68

10/32

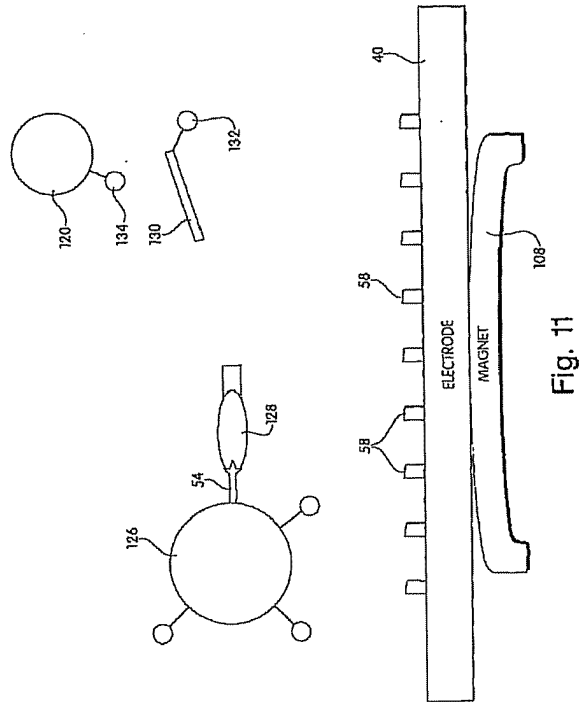


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01229

US 2004/0120168

11/32



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WU 02/01228

EC17/US01/20368

12/32

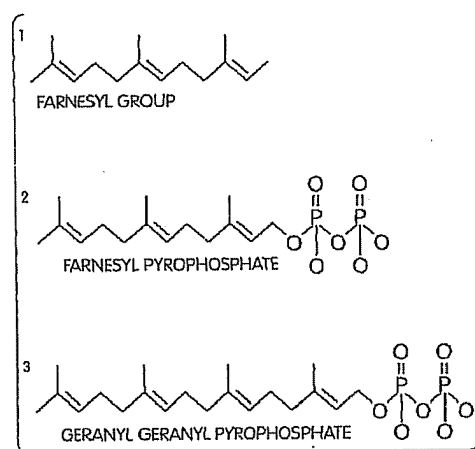


Fig. 12

WO 02/01228

PC/TUS91/20168

13/32

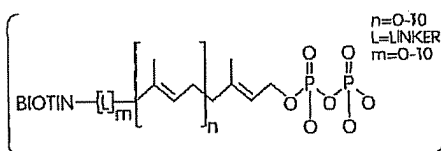


Fig. 13A

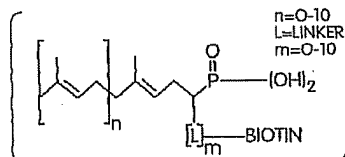


Fig. 13B

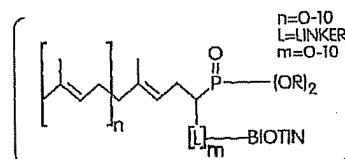


Fig. 13C

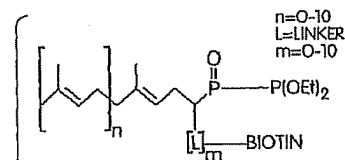


Fig. 13D

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/01228

PC/7/US91/2036H

14/32

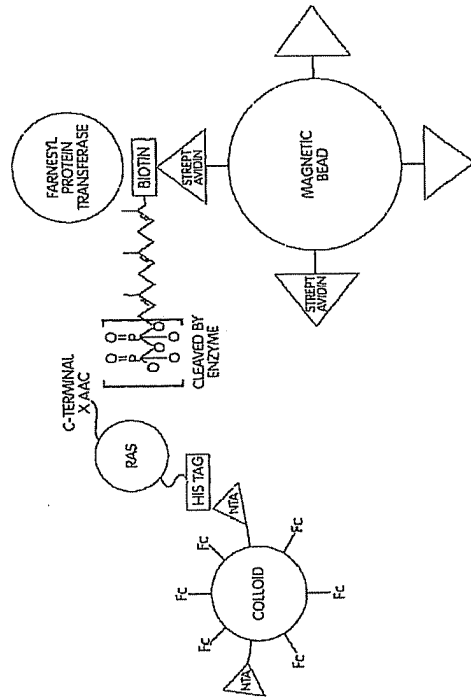


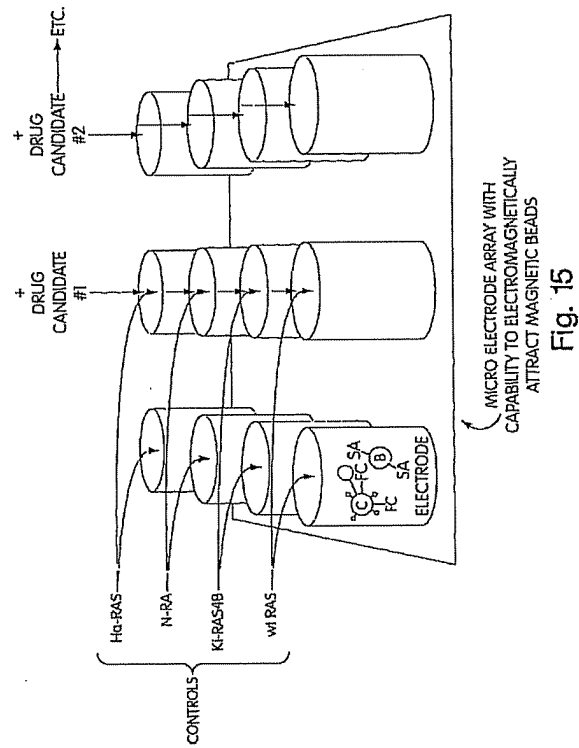
Fig. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

PCT/US01/20368

15/32



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/0122N

CC17/US01/2016H

16/32

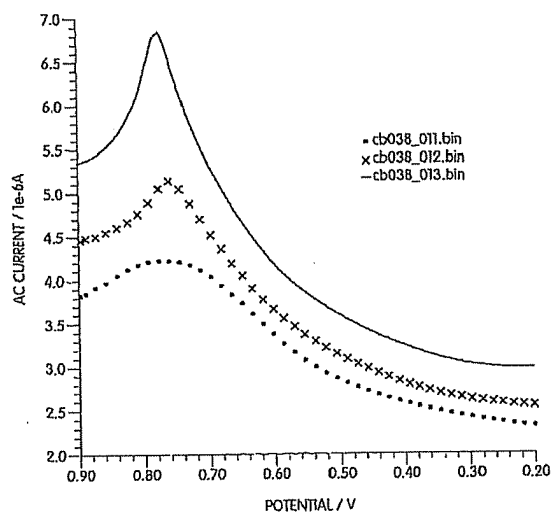


Fig. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WQ 02/01228

UC/T/US01/20168

17/32

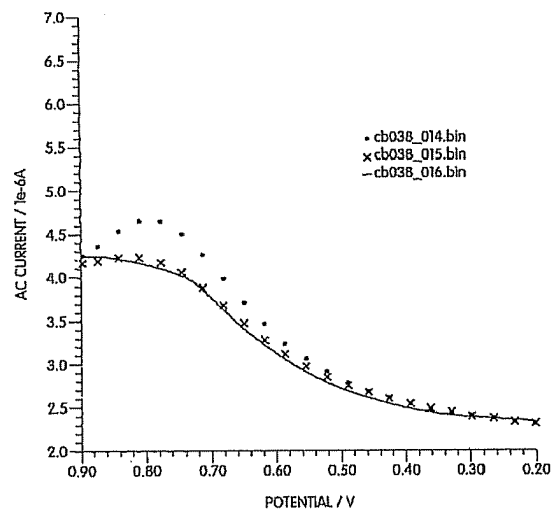


Fig. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/0122H

PC/T/US91/2016H

18/32

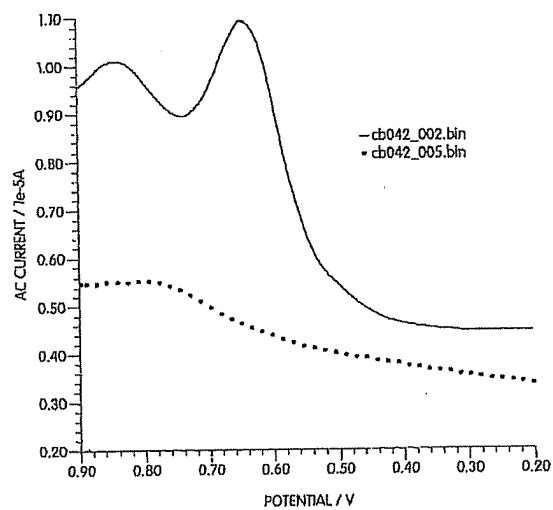


Fig. 18

WU 02/01228

PCT/US01/20168

19/32

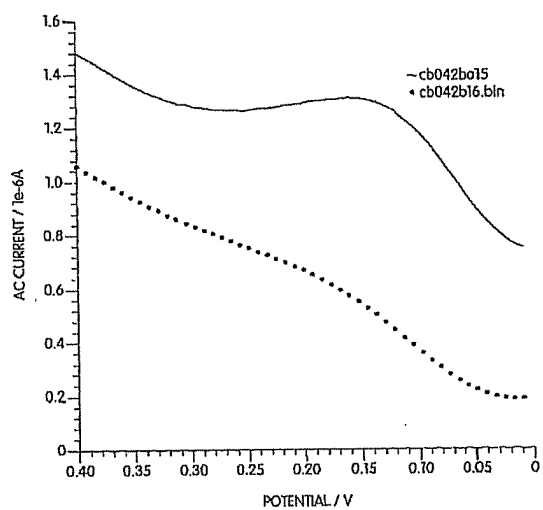


Fig. 19

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WU 02/01228

PC-T/US01/20168

20/32

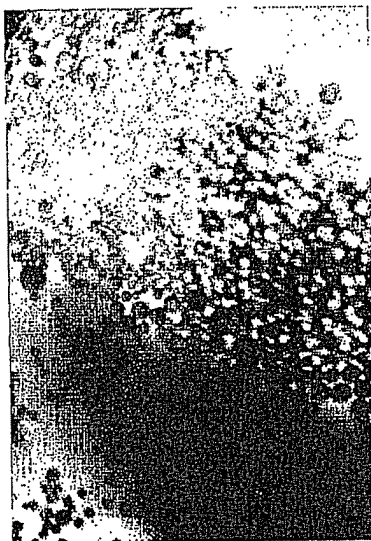


Fig. 20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/01228

PC/T/US01/20168

21/32

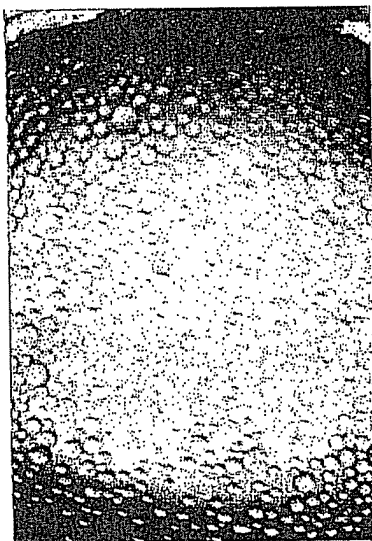


Fig. 21

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/11228

PC17US01/20168

22/32

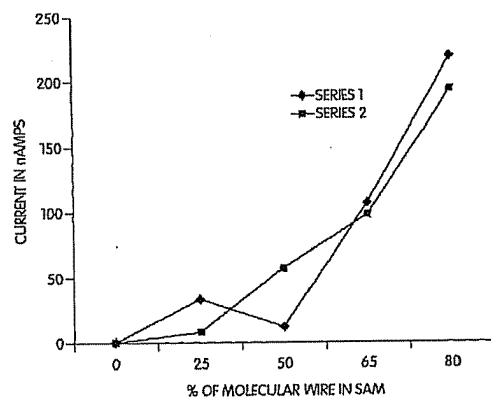


Fig. 22

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

PCT/US01/20368

23/32

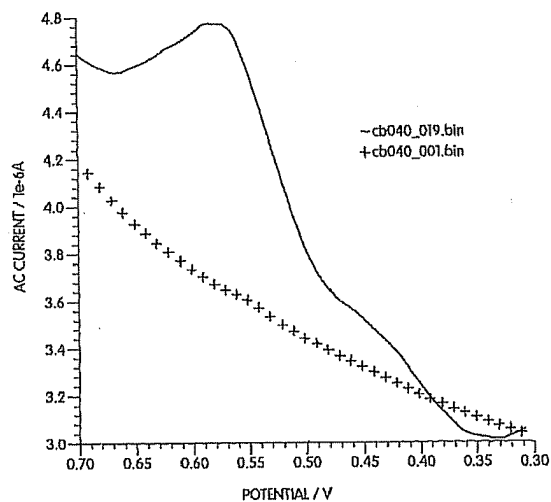


Fig. 23

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/01228

EC/T/US/01/20168

24/32

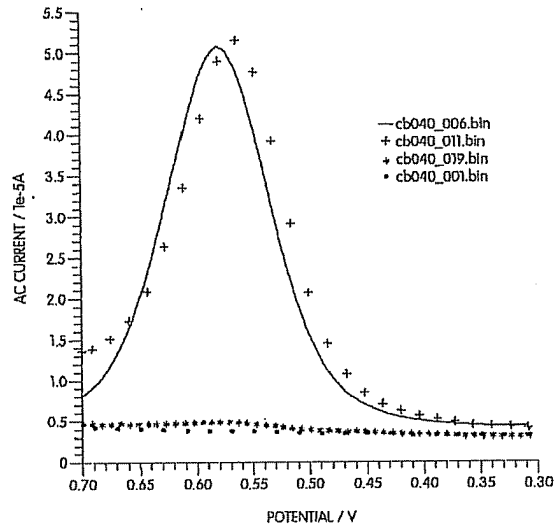


Fig. 24

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/0122H

PC/T/US91/2036H

25/32

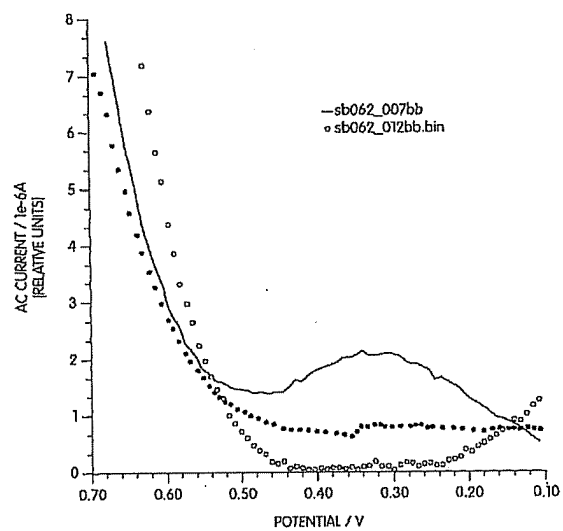


Fig. 25

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/01228

PCT/US91/20168

26/32

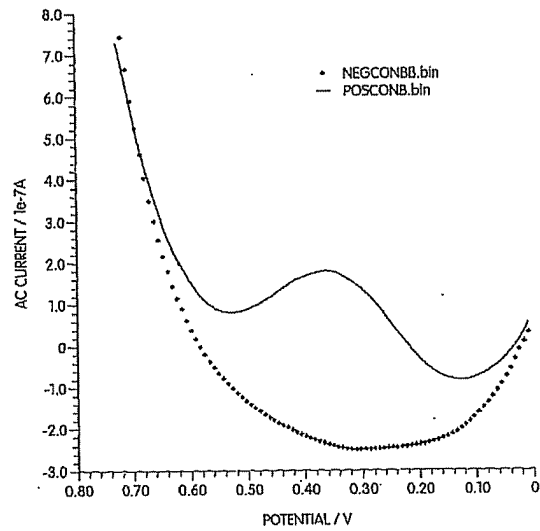


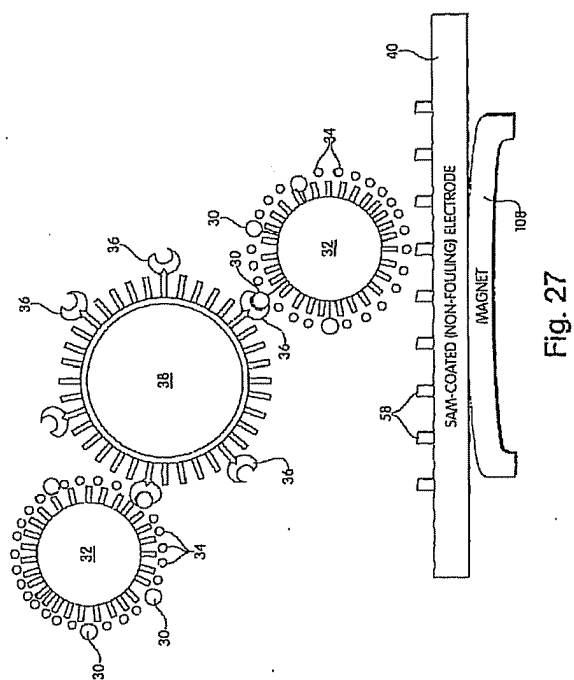
Fig. 26

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/0122H

PCT/US91/2016H

27/32



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/01228

PC17/US01/2016H

28/32

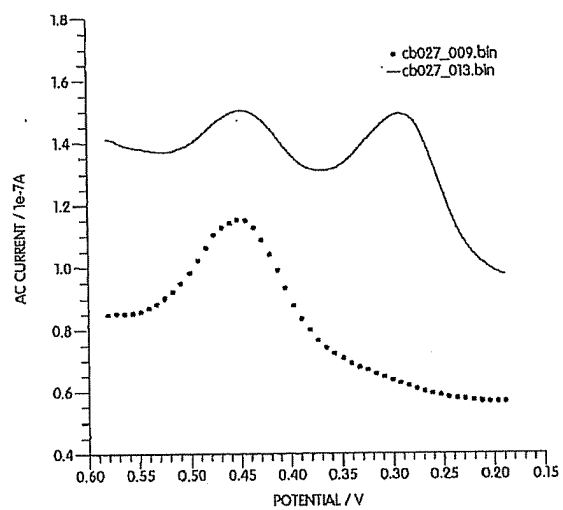


Fig. 28

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WU 02/01228

PC/T/US01/20168

29/32

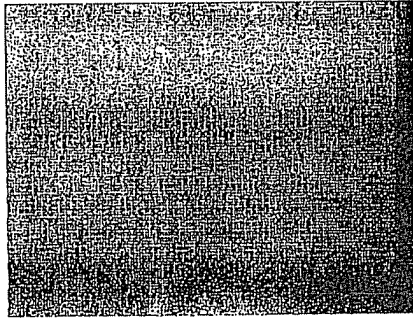


Fig. 29A

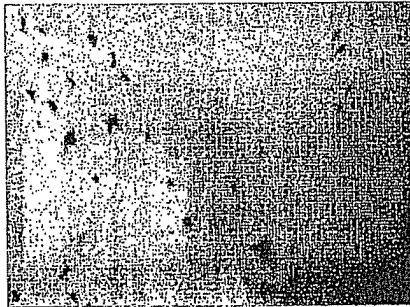


Fig. 29B

WO 02/01228

PC/T/US91/20368

30/32

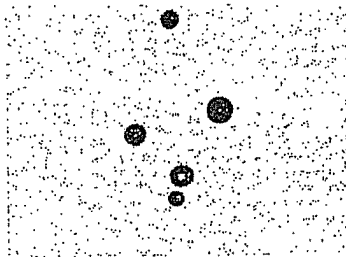


Fig. 30A

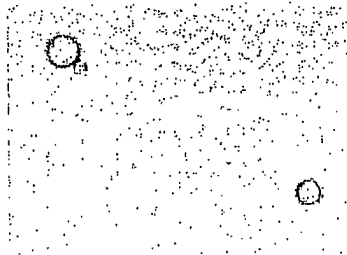


Fig. 30B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WQ 02/01228

02/01228/US/1.2

31/32

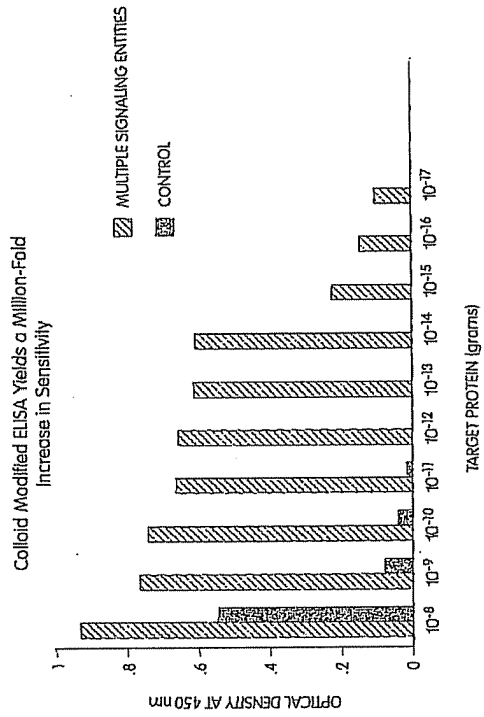


Fig. 31

WU 02/0122H

PCT/US91/2016H

32/32

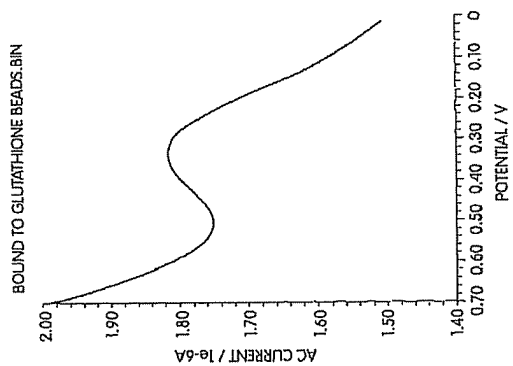


Fig. 32B

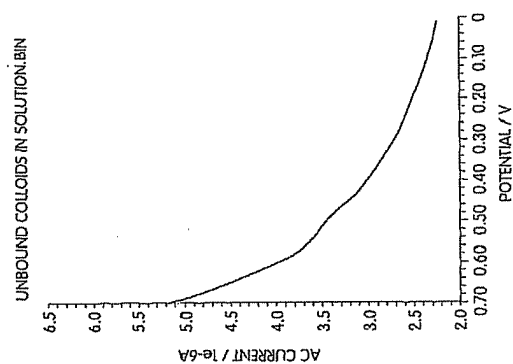


Fig. 32A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/001228 A2

(54) International Patent Classification: G01N 33/50

(51) International Application Number: PCT/US01/20168

(52) International Filing Date: 25 June 2001 (25.06.2001)

(53) Filing Language: English

(56) Publication Language: English

(57) Priority Data: 09/002,778 24 June 2000 (24.06.2000) US

CZ, DE, DK, DM, EP, ES, IE, IS, IT, GB, GR, HU, GM, JP, KR, LK, LU, NL, NO, PT, PE, PG, PH, PL, RU, RO, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UK, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(54) Designated States (optional): AR, AT, AU, BE, BR, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, DM, EP, ES, IE, IS, IT, GB, GR, GM, HU, JP, KR, LK, LU, NL, NO, PT, PE, PG, PH, PL, RU, RO, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UK, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Applicant: BIONEKA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION (US); 142 Church Street, Newton, MA 02459 (US).

Published: with declaration under Article 17(b) of the Patent Cooperation Treaty, without abstract; data not checked by the International Searching Authority.

(72) Inventors: BAMDAD, Cynthia, C.; 142 Church Street, Newton, MA 02459 (US); BAMDAD, R.; Sheraton: 142 Church Street, Newton, MA 02459 (US).

(48) Date of publication of this revised version: 6 March 2003

(74) Agents: OYER, Timothy, J.; Wolf, Greenfield &amp; Sacks, P.C., 100 Atlantic Avenue, Boston, MA 02110 (US).

(75) Information about Correction: see PCT Gazette No. 10(2003) of 6 March 2003, Section II

(81) Designated States (optional): AU, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/001228 A2

(54) Title: INTERACTION OF COLLOID IMMOBILIZED SPECIES WITH SPECIES ON NON COLLOIDAL STRUCTURES

(57) Abstract:

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 17(2)(e), Rules 13ter.(e) and Rule 33)

Applicant's or agent's file reference <b>M1015/7056W0</b>	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (day/month/year) <b>02/07/2002</b>
International application No. <b>PCT/US.01/20168</b>	International filing date (day/month/year) <b>25/06/2001</b>	(Earliest) Priority date (day/month/year) <b>23/06/2000</b>
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC <b>G01N33/40</b>		
Applicant <b>MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION</b>		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(e), that no international search report will be established on the international application for the reasons indicated below:

1. ☐ The subject matter of the international application relates to:

- a. ☐ ascertains theories,
- b. ☐ mathematical theories
- c. ☐ plant varieties,
- d. ☐ animal varieties,
- e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes,
- f. ☐ schemes, rules or methods of doing business,
- g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts,
- h. ☐ schemes, rules or methods of playing games,
- i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy,
- j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy,
- k. ☐ diagnostic methods practised on the human or animal body,
- l. ☐ mere presentations of information,
- m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.


2. ☒ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:

- ☐ the description
- ☒ the claims
- ☐ the drawings

3. ☐ The failure of the molecular and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex O of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard,
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

4. Further comments:  
see annex

Name and mailing address of the International Searching Authority:  European Patent Office, P.O. Box 5818, Postfach 2 600 2200, 600 2200 Tel: (+41-70) 340-2040, Telex: 851 851 Fax: (+41-70) 340-3016	Authorized officer: <b>Stefanie B. Schlegel</b> <i>Stefanie B. Schlegel</i>
---	---

Form PCT/ISA/203 (July 1999)

International Application No. PCT/US 01/20168

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 203

Examination of the claims and description has failed to clearly identify a single problem solved by a single solution to which the application is addressed. Indeed, the claims appear to encompass, using only generalised language, diverse and apparently unrelated subject-matter whilst the description itself (page 3) appears to refer to wide and non-specifically disclosed fields to which the subject-matter of the application may be relevant. Therefore, the description and claims fail to comply with Articles 5 and 6 PCT. Furthermore, given the lack of clarity with regard to the exact subject-matter of the application, it has not been possible to identify any subject-matter with regard to Article 33(3)(b) PCT.

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought (the present claims relate to an extremely large number of possibilities) the present application fails to comply with the clarity and / or conciseness requirements of Articles 5 and 6 PCT (see also Rule 5.1 (a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, no search report can be established for the present application (Article 17 (2) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 56.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is, normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/327	G O 1 N 27/48	Z
G O 1 N 27/48	G O 1 N 33/15	Z
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00	1 0 2
	G O 1 N 37/00	1 0 3
	G O 1 N 27/30	3 5 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TC),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886  
弁理士 村上 清

(72)発明者 バムダッド, シンシア・シー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02458, ニュートン, チャーチ・ストリート 142

(72)発明者 バムダッド, アール・ショシャナ  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02458, ニュートン, チャーチ・ストリート 142

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ20 QQ22 QQ33 QQ41 QR02 QR13  
QR32 QR41 QR42 QR48 QR50 QR55 QR66 QR77 QR83 QS24  
QS34 QS36 QS39 QX01 QX04